



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

FERNANDA CARLA BOMBALDI DE SOUZA

**ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS OBTIDAS PELA COMPLEXAÇÃO DE
QUITOSANA COM OUTROS POLISSACARÍDEOS PARA APLICAÇÃO NA
ENGENHARIA DE TECIDOS VASCULARES**

***THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES OBTAINED BY COMPLEXATION OF CHITOSAN WITH
OTHER POLYSACCHARIDES FOR APPLICATION IN VASCULAR TISSUE ENGINEERING***

CAMPINAS

2018

FERNANDA CARLA BOMBALDI DE SOUZA

**ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS OBTIDAS PELA COMPLEXAÇÃO DE
QUITOSANA COM OUTROS POLISSACARÍDEOS PARA APLICAÇÃO NA
ENGENHARIA DE TECIDOS VASCULARES**

***THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES OBTAINED BY COMPLEXATION OF CHITOSAN WITH
OTHER POLYSACCHARIDES FOR APPLICATION IN VASCULAR TISSUE ENGINEERING***

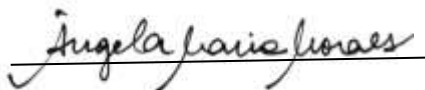
*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em
Engenharia Química.*

*Thesis presented to Graduate Program in Chemical Engineering of
the University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor in Chemical Engineering.*

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Diego Mantovani (Université Laval, Canadá)

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA CARLA BOMBALDI DE
SOUZA E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. ÂNGELA MARIA MORAES



CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/26534-1 e 2017/01858-0;
ELAP

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2635-8126>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

So89e Souza, Fernanda Carla Bombaldi de, 1989-
Estruturas tridimensionais obtidas pela complexação de quitosana com
outros polissacarídeos para aplicação na engenharia de tecidos vasculares /
Fernanda Carla Bombaldi de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Ângela Maria Moraes.

Coorientador: Diego Mantovani.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Engenharia tecidual. 2. Doenças cardiovasculares. 3. Quitosana. 4.
Alginatos. 5. Pectina. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Mantovani, Diego. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Three-dimensional structures obtained by complexation of chitosan
with other polysaccharides for application in vascular tissue engineering

Palavras-chave em inglês:

Tissue engineering

Cardiovascular diseases

Chitosan

Alginate

Pectin

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Bradley David Olsen

Kamilla Swiech Antonietto

Roberto Dalto Fanganiello

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Data de defesa: 09-10-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese de doutorado defendida por Fernanda Carla Bombaldi de Souza e aprovada em 09 de outubro de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dra. Ângela Maria Moraes – Orientadora
Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UNICAMP)

Prof. Dr. Bradley David Olsen
Massachusetts Institute of Technology (MIT/EUA)

Prof. Dra. Kamilla Swiech Antonietto
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP)

Dr. Roberto Dalto Fanganiello
RDF Consultancy

Prof. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro
Instituto de Biologia (IB/UNICAMP)

Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

À minha querida família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, proteção e por todas as oportunidades maravilhosas que colocou em minha vida.

Aos meus queridos pais, Sueli e Ivonir, que sempre me apoiaram com muito carinho em todos os momentos da minha vida. Pai e mãe, vocês tornaram tudo possível e serei eternamente grata por tudo que me proporcionaram. Vocês são meu suporte, exemplo e inspiração e a vocês dedico o meu sucesso.

À minha irmã Renata, meu espelho, minha companheira de vida, minha base. Agradeço pelo suporte emocional e intelectual que me proporcionou durante a realização do trabalho. Poucas pessoas têm a sorte de ter uma pessoa como você em suas vidas, e eu sou uma delas. Tenho o enorme prazer de dividir esta conquista com você, obrigada por tudo.

À minha orientadora, Prof. Dra. Ângela Maria Moraes, a quem dedico profunda admiração. Agradeço por todos os anos de colaboração, aprendizagem e amizade. Você certamente é um exemplo a ser seguido de profissionalismo, dedicação e ética na pesquisa e tenho muito orgulho de ter contado com você para a minha formação.

Ao professor Dr. Diego Mantovani, meu coorientador, e colaboradores da Université Laval, Quebec (Canadá) pela oportunidade de realizar este trabalho conjunto, pelo uso de suas instalações e também pela orientação e auxílio no desenvolvimento de grande parte deste trabalho. Agradeço especialmente aos assistentes de pesquisa e pós-doutorandos Lucie Levesque, Bernard Drouin, Pascale Chevallier, Daniele Pezzoli, Caroline Loy e Vanessa Montañó-Machado.

À minha família, avós, tios e primos, aos meus amigos de infância e de sempre André Kamide, André Alvim, Tamires, Thalita, Henrique e Andressa, e também aos meus queridos amigos Chrystian, Narak, Tsu e Kelvin que sempre torceram por mim com muito carinho.

Aos meus amigos do laboratório da FEQ/UNICAMP e todos aqueles com quem convivi em Campinas durante esta jornada, em especial: Re, Ciça, Luizinha, Lucas, Sérgio, Trinca, Andrea Bierhalz, Cecília Bueno, Karine, Sidi, Dani, André Alvim, Max Tsunada e André Delano. Obrigada por tornarem meus dias mais leves e alegres.

Ao núcleo brasileiro do LBB na Université Laval em Quebec: Dimi, Niedja, Ju, Clayton, Cris, Leticia, Carol, Rodrigo e Luno por todos os momentos maravilhosos e divertidos

que compartilhamos dentro e fora do laboratório.

Às pessoas maravilhosas que tive o prazer de conhecer em Quebec: Hélène Laliberté, Mme Monique, Justin Houde, Omar Castillo, André Rangel, Gonza, Karen, Jéssica, Débora, Paulo Palma, Rogério Castro, Aline Amarante, Omar Metwally, Marc-André, Victor Hamel, Ruchi, Saeideh, Samira, Pedram, Jad, Reza, Natalia Milaniak, Marc-Antoine, Tony, Charles e Joan Saum. Agradeço especialmente àqueles que foram minha família durante minha estadia em Quebec, e por quem tenho imenso carinho: Dimi, Roman, Jessy, Beto, Danuzia, Leonel, Paulinho, Wesley (Du), Cá, Lê Domene, Niedja, Juliano, Elizabeth, Chris, Vanessa e Bruno.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios, e seus alunos, colegas de laboratório, pela convivência tão agradável e pela ajuda na realização de alguns dos ensaios realizados neste trabalho.

Aos professores Dr. Bradley Olsen, Dra. Wirla Tamashiro, Dra Kamilla Swiech e Dr. Roberto Fanganiello, membros da banca avaliadora da defesa de doutorado, bem como o Prof. Celso Bertran, membro das bancas de qualificação, pela grande contribuição oferecida a este trabalho.

Ao professor Dr. Ketul Popat e sua equipe da CSU (Colorado State University), Fort Collins (EUA) pela colaboração na realização dos ensaios de adesão e ativação de plaquetas à superfície dos biomateriais.

À equipe do LRAC, em especial Adilson Brandão, Lucélia Silva e Celso Camargo, pelos ensaios realizados e esclarecimentos prestados.

À UNICAMP, ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Química e a todos os funcionários da FEQ que, de maneira direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos e da reserva técnica, tanto no país (processo #2013/26534-1) quanto no exterior (processo #2017/01858-0).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Doenças cardiovasculares decorrentes da aterosclerose, tais como isquemia cardíaca e doenças vasculares periféricas, são a principal causa de mortes no mundo. Intervenções cirúrgicas para o reparo dos vasos sanguíneos danificados são frequentemente necessárias, incluindo a substituição parcial do vaso ou a utilização de remendos vasculares (*patches*). Existe uma demanda de materiais capazes de atuar de maneira eficaz como substitutos vasculares, especialmente no caso de vasos sanguíneos de pequeno calibre (diâmetro menor que 6 mm), tendo em vista que os normalmente utilizados levam muitas vezes à ocorrência de complicações pós-cirúrgicas que acarretam na reoclusão do vaso. Recentes avanços no desenvolvimento de substitutos vasculares são consequência de abordagens no âmbito da engenharia de tecidos, com a cultura de células vasculares em *scaffolds* biodegradáveis. A quitosana (Ch), um polímero natural biocompatível, é bastante usada na produção de *scaffolds* e sua combinação com outros polissacarídeos, como o alginato (A) e a pectina (P) contribui para a melhoria das propriedades dos biomateriais. Neste trabalho, matrizes de geometria plana foram produzidas com quitosanas de três diferentes massas molares em combinação com A ou P, na presença ou ausência do agente porogênico Kolliphor® P188 (K) e do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B (S), e caracterizadas para verificação da influência da composição das matrizes em suas propriedades. Caracterizações complementares foram feitas para validação de sua potencial aplicação como *patches* na engenharia de tecidos vasculares. O uso de P e Ch de alta massa molar em combinação com S resultou em materiais com comportamento poroviscoelástico e maior resistência mecânica dentre as formulações testadas. Matrizes de Ch-P se destacaram por apresentar maior estabilidade e melhor resposta ao contato com sangue, devido à presença de plaquetas em estágios menos avançados de ativação e menores níveis de trombogenicidade, além de melhor adesão, proliferação e maior viabilidade de células musculares lisas nelas inoculadas. *Scaffolds* de geometria tubular constituídos de Ch-P foram fabricados com sucesso utilizando uma nova metodologia desenvolvida, dando origem a dispositivos homogêneos, estáveis e altamente porosos. A utilização de gel de colágeno para encapsulação de células musculares lisas facilitou a introdução e distribuição homogênea das células na estrutura tridimensional tubular dos *scaffolds*. O presente estudo evidenciou que o uso de pectina complexada com quitosana, uma combinação ainda pouco usada na engenharia de tecidos, tem potencial para ser melhor explorada para este fim. Além disso, o estudo mostrou que as estruturas tridimensionais obtidas em diferentes geometrias são promissoras para a aplicação na engenharia de tecidos vasculares.

Palavras chave: doenças cardiovasculares, engenharia de tecido vascular, *scaffold*, quitosana, alginato, pectina

ABSTRACT

Cardiovascular diseases such as coronary artery and peripheral vascular diseases are the leading cause of death worldwide. Surgical interventions for the repair of damaged blood vessels are often necessary, including partial replacement of the vessel or use of vascular patches. There is a need for materials capable of acting effectively as vascular substitutes, especially in the case of small-caliber blood vessels (diameter smaller than 6 mm), since the materials regularly used often lead to postoperative complications and vessel reocclusion. Recent advances in the development of vascular substitutes are a consequence of tissue engineering approaches, with the culture of vascular cells on biodegradable scaffolds. Chitosan (Ch), a natural biocompatible polymer, is widely used in the production of scaffolds and its combination with other polysaccharides such as alginate (A) and pectin (P) contributes to the improvement of biomaterial properties. In this work, matrices with flat geometry were produced using chitosan of three different molar weights in combination with A or P in the presence or absence of the surfactant Kolliphor® P188 (K) and silicone gel Silpuran® 2130 A/B (S), and characterized to assess the influence of composition on matrix's properties. Additional characterizations were performed to validate their potential application as tissue-engineered vascular patches. The use of chitosan of high molar weight and pectin, in combination with S, resulted in materials with poroviscoelastic behavior and higher mechanical resistance when comparing all formulations tested. Ch-P matrices presented higher stability and better response to blood contact, due to the presence of platelets in the less advanced stages of activation and lower levels of thrombogenicity, as well as better adhesion, proliferation and greater viability of smooth muscle cells. Devices with tubular geometry prepared with Ch-P were successfully fabricated using a new methodology, resulting in homogeneous, stable and highly porous scaffolds. The use of collagen gel for entrapment of smooth muscle cells facilitated the introduction and homogeneous distribution of the cells in the three-dimensional tubular structure. The present study evidenced that the use of chitosan complexed with pectin, a combination still underexplored in tissue engineering, has the potential to be further investigated for this purpose. In addition, this study demonstrated that the three-dimensional structures obtained in different geometries are promising for the use in the reconstruction and regeneration of vascular tissues.

Keywords: cardiovascular diseases, vascular tissue engineering, scaffold, chitosan, alginate, pectin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	alginato
a	raio da amostra (teste mecânico)
alfa-MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i> (MEM) Modificação Alfa (meio de cultura)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	albumina de soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
C	constante empírica (Equação 2, seção 3.2)
c	compliância
CA	capacidade de absorção
Ca ⁺²	íon cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
Ch	quitosana
ChF	quitosana de grau farmacêutico
ChH	quitosana de alta massa molar
ChL	quitosana de baixa massa molar
ChM	quitosana de média massa molar
D	diâmetro inicial (teste de compliância)
DAPI	<i>2-(4-amidinophenyl)-1-indole-6-carboxamide</i>
DD	grau de desacetilação da quitosana (<i>deacetylation degree</i>)
DE	grau de esterificação (<i>degree of esterification</i> ou <i>degree of methoxylation</i>)
DI	deionizada (água)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio de cultura)
DMEMsup	meio de cultura DMEM suplementado
ePTFE	politetrafluoroetileno expandido

FBS	soro fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
FDA	diacetato de fluoresceína
G	grupo guluronato do alginato
HDF	fibroblastos (<i>human dermal fibroblasts</i>)
HDMS	<i>hexamethyldisilazane</i>
HEPES	ácido 2-etanossulfônico (agente tamponante)
HM	<i>high methoxylation pectin</i>
HSMC	células musculares lisas humanas (<i>human smooth muscle cells</i>)
HT-29	<i>human colorectal adenocarcinoma cells</i>
K	Kollipor [®] P188
L	força induzida (teste mecânico)
LDH	lactato desidrogenase (<i>lactate dehydrogenase</i>)
LM	<i>low methoxylation pectin</i>
M	grupo manuronato do alginato
MEV	microscopia eletrônica de varredura
m _{inicial}	massa inicial seca
MM	massa molar
m _{úmida}	massa úmida
M _v	massa molar viscosimétrica
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NaOH	hidróxido de sódio
P	pectina
p	porosidade
PAM	pectina de alta metoxilação
PBM	pectina de baixa metoxilação

PBS	tampão fosfato salino (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCL	policaprolactona
PDMS	polidimetilsiloxano
PEC	complexo polieletrólito (<i>polyelectrolyte complex</i>)
Pen-Strep	penicilina-streptomicina
PET	polietileno tereftalato
r.t.	temperatura ambiente (<i>room temperature</i>)
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RGD	sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico
Rq	rugosidade
S	Silpuran [®] 2130 A/B
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
β	constante empírica (Equação 2, seção 3.2)
SUS	Sistema Único de Saúde
t	tempo
tCh-P	scaffold de geometria tubular produzido com quitosana e pectina
WCA	ângulo de contato (<i>water contact angle</i>)
γ	constante empírica (Equação 2, seção 3.2)
ΔD	diferença de diâmetro (teste de compliância)
ΔP	gradiente de pressão (teste de compliância)
ε	deformação nominal
ρ_{apparent}	densidade aparente
ρ_{material}	densidade real do material
σ	tensão nominal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.1. Colocação do problema	18
1.2. Objetivos.....	20
1.3. Forma de apresentação do trabalho	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Vasos sanguíneos: fundamentos.....	25
2.2. Doenças cardiovasculares.....	26
2.3. Terapias convencionais para substituição de vasos sanguíneos danificados.....	27
2.4. Características desejáveis de enxertos vasculares	29
2.5. Engenharia de tecidos vasculares	30
2.5.1. <i>Scaffolds</i> na engenharia de tecidos vasculares.....	31
2.6. Características relevantes dos biopolímeros.....	33
2.6.1. Quitosana	33
2.6.2. Alginato	35
2.6.3. Pectina.....	37
2.7. Estratégias para a obtenção de <i>scaffolds</i> porosos e com melhores prop. mecânicas.....	40
2.7.1. Porosidade.....	40
2.7.2. Propriedades mecânicas	42
3. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. TESTES PRELIMINARES PARA OBTENÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> PLANOS OU TUBULARES	50
3.1.1. Materiais	50
3.1.2. Métodos	51
3.1.2.1. Determinação da metodologia de produção de <i>scaffolds</i> de geometria plana.....	51
3.1.2.2. Caracterização preliminar dos <i>scaffolds</i> de geometria plana	55
3.1.2.3. Determinação da metodologia de produção de <i>scaffolds</i> de geometria tubular.....	56
3.1.2.4. Caracterização preliminar dos <i>scaffolds</i> de geometria tubular.....	57

3.1.3. Resultados e Discussão.....	58
3.1.3.1. Determinação da metodologia de preparação de scaffolds de geometria plana.....	58
3.1.3.2. Caracterização preliminar dos <i>scaffolds</i> de geometria plana	61
3.1.3.2.1. Aspecto visual	61
3.1.3.2.2. Espessura.....	65
3.1.3.2.3. Morfologia da superfície e da seção transversal	68
3.1.3.2.4. Capacidade de absorção de meio de cultura alfa–MEM.....	74
3.1.3.3. Estabelecimento da metodologia de preparação dos scaffolds de geometria tubular.....	76
3.1.3.3.1. Escolha da membrana a ser utilizada para a moldagem dos scaffolds tubulares.....	76
3.1.3.3.2. Avaliação da concentração da solução de cloreto de cálcio mais adequada para reticulação secundária.....	76
3.1.4. Conclusão	77
3.2. COMPARATIVE STUDY ON COMPLEXES FORMED BY CHITOSAN AND DIFFERENT POLYANIONS: POTENTIAL OF CHITOSAN-PECTIN BIOMATERIALS AS SCAFFOLDS IN TISSUE ENGINEERING	79
3.2.1. Abstract.....	79
3.2.2. Introduction.....	80
3.2.3. Materials and Methods	82
3.2.3.1. Materials.....	82
3.2.3.2. Scaffolds preparation.....	83
3.2.3.3. Scaffolds characterization	83
3.2.3.3.1. Physico-chemical characterization	83
3.2.3.3.2. Behavior in aqueous media	84
3.2.3.3.3. Mechanical properties	85
3.2.3.3.4. Indirect cytotoxicity.....	85
3.2.3.4. Statistical analysis	86
3.2.4. Results and discussion	86
3.2.4.1. Physico-chemical characterization	86
3.2.4.2. Uptake capacity and stability in aqueous media	94
3.2.4.3. Mechanical properties	96

3.2.4.4. Degradation studies	103
3.2.4.5. Indirect cytotoxicity	105
3.2.5. Conclusions.....	107
3.2.6. Acknowledgements.....	107
3.3. POLYSACCHARIDE-BASED TISSUE-ENGINEERED VASCULAR PATCHES	108
3.3.1. Abstract.....	108
3.3.2. Introduction.....	109
3.3.3. Materials and Methods	111
3.3.3.1. Materials.....	111
3.3.3.2. Scaffolds preparation.....	111
3.3.3.3. Scaffolds characterization	112
3.3.3.3.1. Aspect and morphology.....	112
3.3.3.3.2. Uptake capacity and mass loss in culture medium.....	112
3.3.3.3.3. Degradation with lysozyme	112
3.3.3.3.4. Mechanical properties	113
3.3.3.3.5. Platelet adhesion and activation	113
3.3.3.3.6. Thrombogenicity	114
3.3.3.3.7. Cell culture and cytocompatibility assays	115
3.3.3.4. Statistical analysis	116
3.3.4. Results and discussion	116
3.3.4.1. Physical, physicochemical and mechanical properties	116
3.3.4.2. Blood contact response.....	122
3.3.4.3. Cytocompatibility.....	127
3.3.5. Conclusions.....	131
3.3.6. Acknowledgements.....	132
3.4. A SIMPLE AND EFFECTIVE APPROACH TO PRODUCE TUBULAR POLYSSACHARIDE-BASED HYDROGEL SCAFFOLDS	133
3.4.1. Abstract.....	133
3.4.2. Introduction.....	134
3.4.3. Materials and Methods	136
3.4.3.1. Materials.....	136

3.4.3.2. Production of the scaffolds.....	136
3.4.3.3. Scaffolds characterization	137
3.4.3.3.1. Aspect and morphology.....	137
3.4.3.3.2. Stability in aqueous media.....	138
3.4.3.3.3. Mechanical properties	138
3.4.3.3.4. Cell seeding in the tubular scaffolds and mechanical testing.....	139
3.4.3.3.5. Immunofluorescence and histological staining	140
3.4.3.4. Statistical analysis	141
3.4.4. Results and discussion	141
3.4.4.1. Aspect and stability in aqueous media	141
3.4.4.2. Cell seeding in tubular constructs	143
3.4.4.3. Mechanical properties	145
3.4.5. Conclusions.....	148
3.4.6. Acknowledgements.....	148
4. ANÁLISE CONJUNTA DOS RESULTADOS	150
5. CONCLUSÕES	159
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	162
7. REFERÊNCIAS	166
APÊNDICE A	185
APÊNDICE B	191
APÊNDICE C.....	193
APÊNDICE D	195
APÊNDICE E.....	198

Capítulo 1:

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Colocação do problema

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortes no mundo (WHO, 2018). No Brasil, estas doenças são responsáveis por cerca de 30% das mortes registradas a cada ano (Ministério da Saúde, 2018) e os gastos do governo federal com próteses ou materiais especiais utilizados em cirurgias vasculares aumentam progressivamente, tendo sido contabilizado um incremento de 37% nestes gastos entre os anos de 2010 e 2015 (Siqueira *et al.*, 2017).

A aterosclerose é uma condição que leva ao estreitamento dos vasos sanguíneos e acarreta em doenças que afetam artérias de qualquer parte do corpo (National Institutes of Health, 2014), no entanto, o acometimento de vasos de pequeno e médio calibre é a principal causa de óbito (Hasan *et al.*, 2014). Intervenções cirúrgicas são frequentemente realizadas para o tratamento de vasos sanguíneos danificados, incluindo a substituição de um segmento do vaso afetado por um enxerto, a introdução de enxerto a fim de propiciar um novo caminho para o fluxo sanguíneo (*bypass*), ou a utilização de remendos (*patches*) vasculares (Muto *et al.*, 2009; Hasan *et al.*, 2014).

Os materiais atualmente disponíveis para a substituição de vasos sanguíneos danificados em decorrência de doenças cardiovasculares incluem enxertos autólogos, alo- ou xenoenxertos, no entanto, o uso destas abordagens apresenta desvantagens, como disponibilidade limitada, possibilidade de infecções e calcificação, entre outras (Bouten *et al.*, 2011; Hasan *et al.*, 2014). Além disso, enxertos sintéticos também são utilizados, mas atuam como bons substitutos vasculares apenas no caso de artérias de grande calibre (diâmetro maior que 6 mm), caso contrário, complicações pós-cirúrgicas que levam à reoclusão do vaso sanguíneo tendem a ocorrer (Huang *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2014).

Para que apresente um bom desempenho quando utilizado em um paciente acometido por uma doença vascular, um enxerto deve ser compatível mecânica- e histologicamente com o tecido vascular natural (Ucuzian e Greisler, 2011; Hu *et al.*, 2012). Recentes avanços no desenvolvimento de substitutos vasculares são consequência de abordagens no âmbito da engenharia de tecidos, com a cultura de células vasculares em suportes biodegradáveis, ou *scaffolds* (Wingate *et al.*, 2012) e permitem vislumbrar a personalização dos dispositivos obtidos

de acordo com as necessidades individuais de cada paciente (Muto *et al.*, 2009).

Os estudos encontrados na literatura que utilizam a engenharia de tecidos para a obtenção de substitutos vasculares relatam principalmente o uso de matrizes de tecidos decelularizados (Cho *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2017; Lux *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2008; Wilshaw *et al.*, 2006), ou polímeros sintéticos (Shin'oka *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Stock *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2017) como *scaffolds*, e um menor número de trabalhos relatam o uso de polímeros de origem natural para este fim, tanto na utilização como *patch* vascular (Aguiar *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2013; Malm *et al.*, 1992) quanto na aplicação como substituto parcial de um vaso sanguíneo danificado (Aussel *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Ozawa *et al.*, 2013).

Polímeros de origem natural, como polissacarídeos, são extensivamente usados em aplicações na engenharia de tecidos em geral, devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, bem como sua habilidade de mimetizar a matriz extracelular (Dhandayuthapani *et al.*, 2011; Keane and Badylak, 2014). No presente trabalho, optou-se pelo emprego de polissacarídeos, tais quais a quitosana, o alginato e a pectina, na produção dos *scaffolds*, levando em conta sua ainda limitada exploração para a finalidade proposta.

A quitosana é um polissacarídeo linear obtido pela desacetilação da quitina, um polímero encontrado majoritariamente no exoesqueleto de crustáceos e também em alguns fungos. Sua estrutura consiste de unidades de N-acetil-glucosamina e D-glucosamina (Goycoolea *et al.*, 2000). Dependendo de sua origem, a quitosana pode apresentar diferentes massas molares e graus de desacetilação (relacionados à quantidade de grupos amino em sua estrutura), parâmetros que influenciam fortemente as características deste polissacarídeo (Dash *et al.*, 2011). Em baixo pH, a quitosana pode atuar como um polícatión e interagir com polímeros negativamente carregados por meio de interações eletrostáticas, formando os chamados complexos polieletrólitos (Dash *et al.*, 2011).

O alginato é um polissacarídeo aniônico linear que tem capacidade de interagir com a quitosana. Este polímero, extraído de algas marrons, possui estrutura composta de dois tipos de unidades repetitivas, os blocos M (β -1,4-D-manuronato) e blocos G (α -1,4-L-guluronato) (Gombotz e Wee, 1998), cuja proporção e sequência na cadeia afetam suas propriedades (Lee e Mooney, 2012).

A pectina também é um polissacarídeo aniônico, sendo considerada essencialmente linear, por possuir uma cadeia composta por resíduos de ácido D-galacturônico com graus de

metilação e/ou amidação variados, que lhe conferem uma cadeia de alto ou baixo grau de metoxilação, e unidades de L-ramnose, que introduzem uma leve torção na cadeia linear da pectina (Sriamornsak, 2003). Diferentes composições das cadeias laterais, massa molar e o grau de esterificação da pectina afetam fortemente as propriedades físico-químicas deste polissacarídeo (Kokkonen *et al.*, 2007).

A gelificação do alginato ou da pectina pode resultar de interações entre grupos presentes em sua cadeia e íons bivalentes, como o cálcio (Lee e Mooney, 2012; Sriamornsak, 2003). Os dispositivos produzidos pela combinação tanto da pectina como do alginato com a quitosana geralmente possuem maior capacidade de absorção de soluções aquosas, estabilidade em faixas de pH maiores e melhores propriedades mecânicas do que aqueles produzidos apenas com quitosana (Prabaharan and Sivashankari, 2016). A fim de conferir a estes dispositivos características adequadas à aplicação como *scaffolds* na engenharia de tecidos, o tensoativo Kolliphor® P188 pode ser adicionado à mistura polimérica durante seu processamento, dando origem a estruturas porosas pela formação e estabilização de uma espuma (Bueno *et al.*, 2014). Além disso, o reforço mecânico dessas estruturas pode ser realizado pela adição do silicone Silpuran® 2130 A/B (Pires e Moraes, 2015).

Neste contexto, verifica-se a necessidade do desenvolvimento de dispositivos que sejam capazes de promover o reparo em tecidos vasculares danificados de maneira eficaz, superando as limitações existentes para os materiais comumente utilizados no tratamento de doenças que afetam estes tecidos. Dessa forma, a proposta deste trabalho é prover, por meio da engenharia de tecidos e lançando mão do uso de matrizes constituídas essencialmente de polímeros naturais, dispositivos capazes de atuar como substitutos vasculares tanto em aplicações como *bypass* quanto como *patch* vascular.

1.2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de *scaffolds* constituídos de quitosana complexada com alginato ou pectina, de geometria plana ou tubular, capazes de atuarem na reparação de tecidos vasculares danificados. Para isso, o estudo foi concebido em três etapas principais:

- i. Obtenção de matrizes poliméricas planas, densas e porosas, mecanicamente reforçadas ou não, produzidas com quitosanas de três diferentes massas molares em

combinação com alginato ou pectina. Nesta etapa, teve-se por meta determinar o efeito da variação das características da quitosana e do poliânion utilizado para complexação nas propriedades físicas, físico-químicas e mecânicas dos materiais obtidos, bem como em sua citotoxicidade. A análise destas propriedades permitiu avaliar o potencial de sua utilização como *scaffolds* na engenharia de tecidos.

- ii. Validação das propriedades de *scaffolds* planos obtidos na etapa anterior no âmbito da engenharia de tecidos vasculares. Nesta etapa, teve-se por objetivo investigar a hemocompatibilidade e a citocompatibilidade das matrizes densas e porosas produzidas anteriormente. Para isso, a resposta dos materiais a células do sangue, incluindo sua trombogenicidade, bem como o desempenho de células musculares lisas neles cultivadas, foram averiguadas.
- iii. Produção e caracterização de matrizes tubulares, a partir de formulações identificadas como promissoras na etapa anterior, para o uso na engenharia de tecidos vasculares. Nesta etapa, teve-se por alvo desenvolver uma metodologia de produção de dispositivos cilíndricos e analisar aspectos fundamentais relevantes para o uso dos materiais obtidos como *scaffolds*, como sua morfologia, estabilidade, propriedades mecânicas e capacidade de atuar como suporte para o crescimento de células musculares lisas.

1.3. Forma de apresentação do trabalho

Este trabalho está organizado na forma de capítulos, os quais serão sucintamente descritos nos parágrafos a seguir.

No **presente capítulo** encontra-se uma introdução geral ao tema deste trabalho identificando-se sua motivação e seus objetivos.

No **Capítulo 2**, uma revisão bibliográfica incluindo aspectos teóricos relevantes ao tema abordado é apresentada, abrangendo fundamentos sobre vasos sanguíneos, doenças cardiovasculares e terapias convencionais para a substituição de vasos sanguíneos danificados, características desejáveis de enxertos vasculares e o uso da engenharia de tecidos para a obtenção de materiais com propriedades adequadas, além de características relevantes de biopolímeros para utilização na produção *scaffolds* para a engenharia de tecidos e estratégias para melhorar suas propriedades.

No **Capítulo 3**, a metodologia experimental empregada, os resultados gerados e sua discussão são apresentados, em quatro diferentes seções. Na primeira seção, os resultados de testes preliminares para a determinação da metodologia a ser utilizada na produção de matrizes poliméricas de geometrias plana e tubular à base de quitosana complexada com alginato ou pectina são mostrados. As caracterizações preliminares do material produzido levaram à exclusão das formulações com características não adequadas à aplicação proposta como *scaffolds* na engenharia de tecidos.

Nas seções 3.2 a 3.4 são apresentados três artigos científicos, tendo sido o primeiro deles publicado no veículo indexado *International Journal of Biological Macromolecules* (com fator de impacto de 4,784), o segundo na revista *Materials Science and Engineering C* (com fator de impacto de 4,959) e o terceiro no *Journal of Applied Polymer Science* (com fator de impacto de 2,188). Os dados experimentais foram obtidos na FEQ/UNICAMP em colaboração com os grupos de pesquisas do professor Diego Mantovani, da *Université Laval* em Quebec - QC, no Canadá e do professor Ketul C. Popat, da *Colorado State University*, em Fort Collins - CO, nos Estados Unidos.

No primeiro dos artigos, intitulado "Comparative study on complexes formed by chitosan and different polyanions: Potential of chitosan-pectin biomaterials as scaffolds in tissue engineering", realizou-se um estudo comparativo entre matrizes preparadas pela combinação de quitosana com pectina ou alginato, na presença ou não de um agente porogênico e de um gel de silicone, e usando quitosana de duas diferentes massas molares. O efeito da variação do poliânion nas propriedades do material obtido e a sua potencial aplicação como *scaffolds* na engenharia de tecidos foram avaliados. Como consequência dos distintos níveis de interação entre os polímeros, bem como diferentes graus de reticulação e organização das cadeias poliméricas nas matrizes obtidas, estas apresentaram propriedades físicas, físico-químicas e mecânicas diversas. O maior impacto da variação do poliânion foi observado nas propriedades mecânicas dos *scaffolds*, sendo que aqueles produzidos com pectina apresentaram-se mais resistentes. Todas as formulações foram consideradas apropriadas para aplicações na engenharia de tecidos, tendo em vista sua estabilidade e ausência de citotoxicidade.

No segundo artigo, intitulado "Polysaccharide-based tissue-engineered vascular patches", *scaffolds* de geometria plana constituídos de quitosana complexada com alginato ou pectina foram produzidos e caracterizados segundo aspectos relacionados à sua

hemocompatibilidade e citocompatibilidade, considerando sua aplicação como *patches* para reconstrução de tecidos vasculares. Materiais obtidos com o uso da pectina em suas formulações apresentaram propriedades mais adequadas no que diz respeito à sua degradação, resistência mecânica e adesão de células musculares lisas.

No terceiro artigo, intitulado “A simple and effective approach to produce tubular polysaccharide-based hydrogel scaffolds”, o complexo polimérico quitosana-pectina foi utilizado na produção de estruturas tubulares segundo uma nova metodologia desenvolvida, o que resultou em *scaffolds* estáveis e altamente porosos, nos quais se avaliou o desempenho de células musculares lisas.

No **Capítulo 4** realiza-se uma análise comparativa dos resultados, interpretando-os e discutindo-os de maneira conjunta. No **Capítulo 5** são mostradas as conclusões geradas tendo em vista todos os resultados obtidos e no **Capítulo 6** são apontadas sugestões para trabalhos futuros. Por fim, no **Capítulo 7**, são apresentadas as referências científicas utilizadas no estudo. O trabalho se encerra com a apresentação de cinco apêndices, onde são detalhadas algumas metodologias utilizadas em seu desenvolvimento.

Capítulo 2:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vasos sanguíneos: fundamentos

Os vasos sanguíneos são canais, ou dutos, através dos quais o sangue é distribuído aos tecidos do corpo (Applegate, 2012). Eles fazem parte do sistema cardiovascular, um sistema complexo, que desempenha funções na modulação metabólica e nos processos hemodinâmicos, bem como no transporte de substâncias como, por exemplo, gases, nutrientes e hormônios (Miller e Burnett, 1990).

Os vasos sanguíneos podem apresentar diferentes tamanhos e estruturas conforme ilustrado na Figura 2.1. O tecido vascular é constituído basicamente de músculo liso, tecido conectivo elástico e fibroso, sendo sua estrutura dividida em três camadas distintas (Silverthorn, 2010).

Tipo de vaso sanguíneo	Ilustração*	Diâmetro interno médio	Espessura média da parede	Formação relativa do tecido			
				Endotélio	Tecido elástico	Músculo liso	Tecido fibroso
Artéria elástica		1,5 cm	1,0 mm	Alta	Alta	Alta	Baixa
Artéria muscular		6,0 mm	1,0 mm	Baixa	Baixa	Alta	Alta
Arteriola		37,0 µm	6,0 µm	Baixa	Baixa	Alta	Alta
Capilar		9,0 µm	0,5 µm	Alta	Baixa	Baixa	Baixa
Vênula		20,0 µm	1,0 µm	Baixa	Baixa	Alta	Alta
Veia		5,0 mm	0,5 mm	Baixa	Baixa	Alta	Alta

Figura 2.1: Tipos de vasos sanguíneos e suas características (adaptado de MTC, 2014). As relações de tamanho das ilustrações não são proporcionais. *Vasos menores são mostrados em tamanho maior para maior detalhamento.

A camada mais interna, denominada túnica íntima, é formada por um revestimento de endotélio apoiado em uma membrana basal de tecido conjuntivo com fibras elásticas. A camada média, ou túnica média, é constituída de musculatura lisa. Além de proporcionar apoio para o vaso sanguíneo, esta camada também é responsável pela regulação do fluxo e da pressão sanguínea, por meio da contração ou dilatação que promove a variação do diâmetro do vaso. Já a camada externa, denominada túnica adventícia, fixa o vaso aos tecidos circundantes. Ela é constituída de tecido conjuntivo, com quantidades variáveis de fibras elásticas e colágenas (Applegate, 2012). Conforme mostrado na Figura 2.1, a constituição dos vasos varia dentre os diferentes tipos existentes.

2.2. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são um grupo de doenças que afetam o coração, os vasos sanguíneos, ou ambos (WHO, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018), as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortes no mundo. No Brasil, estas doenças são também a primeira causa de óbito, sendo responsáveis por cerca de 30% das mortes registradas no país a cada ano (Ministério da Saúde, 2018).

Tendo em vista a elevada incidência de doenças cardiovasculares na população brasileira, a Sociedade Brasileira de Cardiologia estabeleceu o Programa Nacional de Prevenção Cardiovascular. Como parte deste programa, foi publicado um documento com diretrizes para a prevenção de doenças cardiovasculares no Brasil. Neste documento são identificados fatores de risco para estas doenças, tais como fumo, obesidade, hipertensão e diabetes, e apontadas medidas para auxiliar na sua redução, como mudança de hábitos alimentares e prática de atividades físicas (Simão *et al.*, 2013).

Mesmo com a existência de tais diretrizes, o impacto socioeconômico relacionado a doenças cardiovasculares é crescente, sendo considerado um problema para a saúde pública. Este problema é evidenciado pelo alto investimento do governo federal, através do Sistema Único de Saúde (SUS), na utilização de próteses e *stents* em cirurgias vasculares. Os gastos relacionados a estes procedimentos apresentaram um aumento de 37 % entre 2010 e 2015, totalizando 140 milhões de reais em 2015 (Siqueira *et al.*, 2017).

A aterosclerose é uma condição que leva ao desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares. Esta condição diz respeito ao estreitamento dos vasos sanguíneos devido ao

acúmulo de placas de lipídios ou tecidos fibrosos em sua parede interna e pode afetar qualquer artéria do corpo. Como resultado, diferentes doenças podem se desenvolver, dependendo da localização do vaso sanguíneo afetado, tais como a isquemia cardíaca (estreitamento dos vasos que fazem o suprimento de sangue dos músculos cardíacos) e as doenças vasculares periféricas (comprometimento dos vasos que levam o sangue até os braços e pernas) (National Institutes of Health, 2014).

Estas enfermidades requerem muitas vezes uma intervenção cirúrgica nos pacientes para a substituição dos vasos sanguíneos danificados, a fim de se restabelecer a circulação sanguínea no local e conseqüentemente as funções dos tecidos adjacentes (Gong e Niklason, 2006; Hu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013a). O item seguinte trata sucintamente das terapias convencionais utilizadas para este fim.

2.3. Terapias convencionais para substituição de vasos sanguíneos danificados

Diferentes tipos de intervenção cirúrgica são realizados para o tratamento de vasos sanguíneos danificados, incluindo a substituição de um segmento do vaso afetado por um enxerto, a introdução de enxerto a fim de propiciar um novo caminho para o fluxo sanguíneo (*bypass*), ou a utilização de “remendos” vasculares (do inglês *vascular patches*), que auxiliam no fechamento do vaso sanguíneo após procedimentos cirúrgicos que envolvem incisão longitudinal e parcial ruptura do vaso (Muto *et al.*, 2009; Hasan *et al.*, 2014). Os procedimentos listados são ilustrados na Figura 2.2.

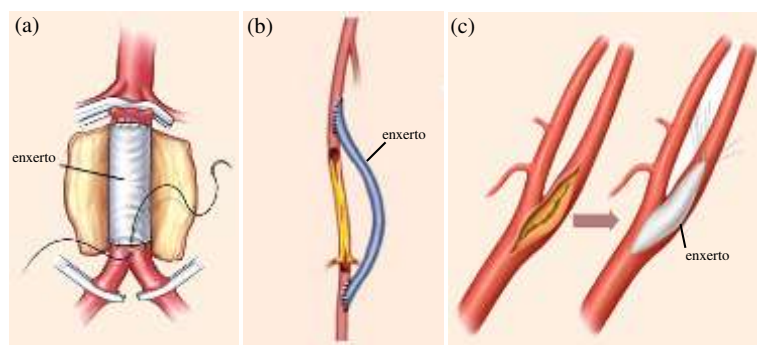


Figura 2.2: Tipos de intervenção cirúrgica realizados no tratamento de vasos sanguíneos danificados. (a) interposição de enxerto para restabelecer a continuidade do vaso aorta; (b) *bypass* vascular; (c) *patch* vascular (adaptado de Society for Vascular Surgery (2018); NQVascular (2018) e Vascular Surgery (2017)).

Os materiais atualmente disponíveis para a substituição de vasos sanguíneos danificados em decorrência de doenças cardiovasculares incluem os enxertos autólogos (auto-enxertos), os enxertos fornecidos por doadores humanos (aloenxertos) e os enxertos obtidos a partir de doadores animais, como bovinos e suínos (xenoenxertos), além de enxertos sintéticos, cujas formas comercialmente disponíveis são constituídas dos polímeros politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) ou polietileno tereftalato (PET) (Bouten *et al.*, 2011; Ucuzian e Greisler, 2011).

O uso dos auto-enxertos e dos aloenxertos é limitado devido a coletas anteriores de tecido no paciente, que inviabilizam outras coletas por poderem colocá-lo em risco, à falta de doadores ou também à variabilidade anatômica. Os xenoenxertos por sua vez, são mais propícios a causarem infecções e sofrerem calcificação (Hasan *et al.*, 2014).

Os enxertos sintéticos foram criados a fim de contornar três problemas relacionados às cirurgias vasculares: o desempenho insatisfatório dos enxertos provenientes de doadores tanto humanos como animais, conforme explicado anteriormente; o fato de que não há disponibilidade de vasos sanguíneos de largo diâmetro para serem retirados e servirem como enxertos autólogos; e a limitada disponibilidade de vasos sanguíneos de pequeno diâmetro em muitos pacientes, excluindo, também nesse caso, a possibilidade de se fazer um enxerto autólogo (Kellar *et al.*, 2011), no caso da necessidade de substituição de parte do vaso sanguíneo.

Os enxertos sintéticos, no entanto, atuam como bons substitutos para vasos sanguíneos apenas no caso de artérias de largo diâmetro (diâmetro maior que 6 mm) e com intenso fluxo sanguíneo, caso contrário, tendem a apresentar muitos problemas, tais como a hiperplasia intimal (espessamento da camada mais interna do vaso sanguíneo devido ao aumento na proliferação celular que ocorre em resposta a lesões vasculares), reestenose (reoclusão do vaso sanguíneo), alto grau de trombogenicidade (formação de coágulos de sangue no interior do vaso sanguíneo), aneurisma (dilatação da parede enfraquecida de uma artéria) e outras complicações relacionadas à resposta imune. Estes problemas estão ligados principalmente à falta de características histológicas que os assemelhem ao tecido vascular nativo, bem como à incompatibilidade mecânica entre ambos (Ucuzian e Greisler, 2011; Hu *et al.*, 2012(b); Huang *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2014).

Devido ao grande número de complicações atreladas ao uso de enxertos vasculares com diâmetros menores que 6 mm, muitos estudos vêm sendo realizados visando-se obter

dispositivos que atendam as características necessárias à aplicação pretendida. A demanda para a substituição de vasos deste calibre é grande, pois as patologias que afetam vasos de pequeno e médio calibre são as principais causas de óbito (Hasan *et al.*, 2014).

Além da substituição parcial de um vaso afetado por um enxerto, outro tipo de abordagem cirúrgica, mencionada anteriormente, é a utilização de *patches* vasculares. A aplicação de *patches* vasculares é realizada a fim de prevenir o estreitamento do local de uma arteriotomia (incisão cirúrgica arterial) ou tratar uma doença oclusiva do vaso sanguíneo. Os *patches* são muito usados no caso de endarterectomia carotídea, uma cirurgia que visa remover uma lesão obstrutiva da artéria carótida, eliminando a placa de aterosclerose (Heberer e van Dongen, 1989; Marques *et al.*, 2007). A endarterectomia envolve uma incisão longitudinal da artéria seguida de seu fechamento primário ou por intermédio de um *patch* vascular. A segunda abordagem é mais vantajosa por reduzir o risco de complicações pós-operatórias que levam à reoclusão do vaso (Mannheim *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2009; Rerkasem e Rothwell, 2011).

Diferentes materiais são usados como *patches*, sendo os mais empregados as veias autógenas, as próteses biológicas de pericárdio bovino e as próteses sintéticas de Dacron e de ePTFE (Marques *et al.*, 2007). Com o uso de materiais biológicos xenogênicos, a suscetibilidade a infecções aumenta e, por outro lado, o uso de vasos autólogos pode levar ao estreitamento progressivo do vaso como resultado de hiperplasia intimal (Heberer e van Dongen, 1989), conforme mencionado anteriormente.

2.4. Características desejáveis de enxertos vasculares

As características de um enxerto vascular ideal incluem resistência mecânica compatível com os tecidos vasculares naturais, com o objetivo de torná-los capazes de suportar a pressão sanguínea e a tensão de cisalhamento provocada pela circulação do sangue; capacidade de retenção de suturas; baixa trombogenicidade; resistência a infecções e potencial para se adequar ao crescimento do indivíduo, para que não seja necessária sua troca em intervalos de tempo pequenos (Ucuzian e Greisler, 2011; Kellar *et al.*, 2011; Kurobe *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012(a); McClure *et al.*, 2012). Outro fator importante que deve ser levado em conta ao se desenvolver estes dispositivos é que uma endotelização rápida do enxerto vascular é requerida, pois este fenômeno promove aumento na resistência à aderência de plaquetas à parte interna do material e impede a reoclusão do vaso sanguíneo (Browning *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Como o intuito de se atender a maior quantidade possível das características listadas e superar as limitações referentes ao uso dos enxertos vasculares sintéticos, o emprego da engenharia de tecidos na produção de substitutos vasculares se mostra uma boa alternativa para promover a regeneração do vaso danificado (Krawiec e Vorp, 2012).

2.5. Engenharia de tecidos vasculares

O princípio do uso da engenharia de tecidos para aplicações vasculares é a substituição do tecido vascular danificado por um novo vaso sanguíneo obtido a partir do cultivo de células autólogas ou doadas por terceiros, na presença de fatores de crescimento, sobre um *scaffold* (matriz celular artificial, que atua como suporte e molde para o crescimento celular) constituído de material biodegradável. As células se proliferam enquanto o *scaffold* é biodegradado, tendo como resultado um novo tecido vascular que se comporta como o nativo (Kurobe *et al.*, 2012). Na Figura 2.3 é apresentado um esquema das etapas envolvidas na engenharia de tecidos.

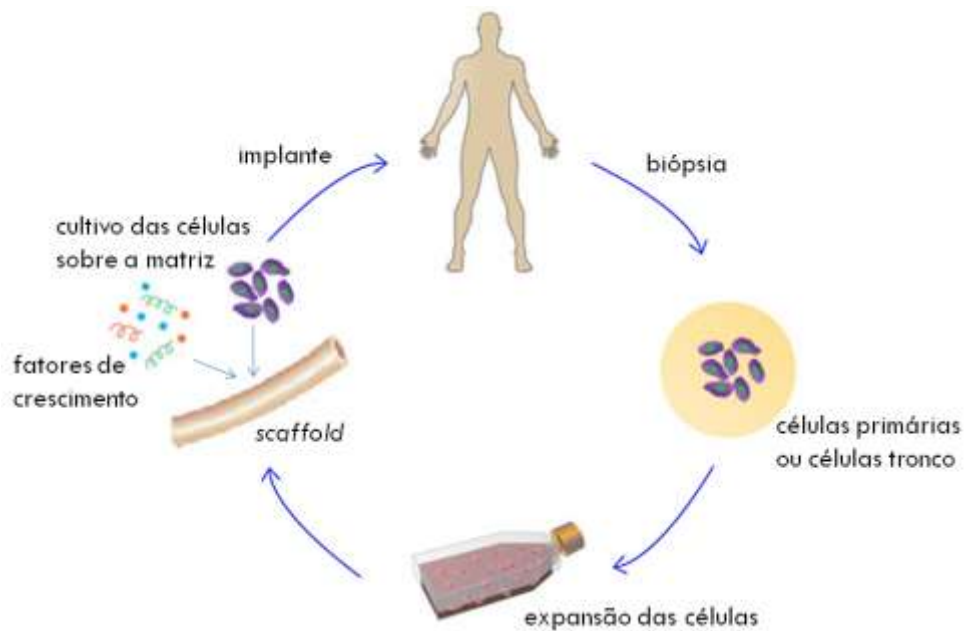


Figura 2.3: Ilustração esquemática das etapas envolvidas na engenharia de tecidos (adaptado de Dvir *et al.*, 2011).

As células comumente empregadas na engenharia de tecidos vasculares são as endoteliais e as musculares lisas, ambas constituintes dos vasos sanguíneos. Estas células são

utilizadas tanto isoladas (Wingate *et al.*, 2012) como em co-culturas (Wu *et al.*, 2007). Alguns trabalhos também relatam o uso de células tronco mesenquimais, capazes de se diferenciar em células vasculares, em aplicações com esta finalidade (Hashi *et al.*, 2007; Mirza *et al.*, 2008).

Uma das grandes vantagens dos substitutos vasculares obtidos pela engenharia de tecidos é que estes materiais têm potencial de crescimento e, portanto, de adaptabilidade ao local da lesão com o decorrer do tempo (Kurobe *et al.*, 2012).

2.5.1. Scaffolds na engenharia de tecidos vasculares

Muitas metodologias são descritas na literatura para a obtenção de substitutos vasculares com o uso da engenharia de tecidos e todas elas possuem um objetivo em comum: obter estruturas que mimetizem a matriz celular e as funções biológicas dos vasos sanguíneos, assim como suas propriedades mecânicas, e que promovam a manutenção da homeostase hemodinâmica (Ucuzian e Greisler, 2011). Muitas características são exigidas de um *scaffold* para que este seja adequado à engenharia de tecidos, como biocompatibilidade; mimetização da matriz extracelular; composição química adequada (para permitir a adsorção de componentes relevantes do sangue, assegurar estabilidade adequada no meio de cultivo utilizado *in vitro* e para apresentar adequada taxa de degradação *in vivo*); adequada rugosidade; presença de poros com arquitetura adequada no que diz respeito à distribuição, tamanho e interconectividade; resistência mecânica compatível com a do tecido lesado; facilidade no processamento e na esterilização (Hutmacher, 2000; Mao *et al.*, 2003; Barbanti *et al.*, 2005; Adekogbe e Ghanem, 2005; Ikada, 2006; Yang *et al.*, 2010; Holzapfel *et al.*, 2013).

Os materiais utilizados para a produção de *scaffolds* podem ser tanto de origem sintética como natural. Os materiais sintéticos, como o polietilenoglicol, o polietileno tereftalato, o ácido poliglicólico, e o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) por exemplo, são atrativos porque podem ter suas propriedades manipuladas de acordo com as necessidades de sua aplicação (Keane e Badylak, 2014). No entanto, alguns destes materiais podem liberar produtos de degradação ácidos e tóxicos, causando reações adversas locais e sistêmicas que resultam na rejeição dos implantes (Lee *et al.*, 2014).

Já os materiais de origem natural incluem tanto as proteínas (colágeno, elastina), como matrizes derivadas da decelularização de diversos tecidos (derme, submucosa intestinal) e também os biopolímeros (proteínas com a seda, ou polissacarídeos como a quitosana). Os

materiais de origem natural são atrativos porque possuem maior biocompatibilidade e menor imunogenicidade quando comparados aos de origem sintética para o uso em aplicações médicas (Keane e Badylak, 2014).

O grupo de pesquisa da Prof. Dra. Ângela Maria Moraes possui vasta experiência na obtenção e caracterização de dispositivos constituídos de quitosana (Salgado *et al.*, 2012) e outros polissacarídeos, como o alginato, a pectina, a goma guar e a xantana, na forma de complexos polieletrólitos para aplicação no tratamento de lesões dérmicas (Marreco *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno e Moraes, 2011; Veiga e Moraes, 2012; Bellini *et al.*, 2012; Bellini *et al.*, 2014; Bueno *et al.*, 2014; Pires e Moraes, 2015; Bueno *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Bierhalz e Moraes, 2016; Bierhalz *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017). No entanto, o uso destes materiais não foi explorado anteriormente para a obtenção de *scaffolds* para a engenharia de tecidos vasculares.

Poucos trabalhos relatam a produção de *scaffolds* constituídos exclusivamente de polissacarídeos para a obtenção de dispositivos tubulares e alguns deles são exemplificados em seguida. Aussel *et al.* (2017) demonstraram a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de *scaffolds* tubulares constituídos de quitosana e indicaram seu potencial para aplicação na engenharia de tecidos vasculares. Silva *et al.* (2018) desenvolveram uma metodologia que permite a obtenção de estruturas tubulares a base de quitosana com propriedades ajustáveis para aplicação na engenharia de tecidos. Além disso, Ozawa *et al.* (2013) produziu estruturas tubulares constituídas de um gel de alginato, capazes de mimetizar morfologicamente os vasos sanguíneos.

Atualmente, as abordagens mais utilizadas na obtenção de *patches* vasculares para engenharia de tecidos incluem principalmente o uso de matrizes decelularizadas (Cho *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2017; Lux *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2008; Wilshaw *et al.*, 2006) ou polímeros sintéticos (Shin'oka *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Stock *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2017), sendo poucos trabalhos relatados na literatura referentes ao desenvolvimento de *scaffolds* baseados em polímeros naturais para essa aplicação específica (Aguilar *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2013; Malm *et al.*, 1992).

No presente trabalho, optou-se pelo emprego de polissacarídeos na produção dos *scaffolds*, levando em conta sua ainda limitada exploração para a finalidade proposta. Os polissacarídeos escolhidos são a quitosana, o alginato e a pectina, mais detalhadamente descritos a seguir.

2.6. Características relevantes dos biopolímeros

2.6.1. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear e semicristalino, com massa molar entre 10 e 1.000 kDa. Sua estrutura química consiste de um copolímero formado por unidades de N-acetil-D-glicosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose) e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose) unidas por ligações glicosídicas β -(1,4) (Goycoolea *et al.*, 2000; Hamman, 2010). A quitosana não é comumente encontrada na natureza, mas pode ser facilmente obtida de outro polímero natural, a quitina, por meio da desacetilação em meio alcalino. A quitina é comumente encontrada na carapaça de crustáceos, em insetos, moluscos, e também na parede celular de alguns fungos (Croisier e Jérôme, 2013).

Dependendo de sua origem, a quitosana pode apresentar diferentes graus de desacetilação e massas molares, parâmetros que influenciam fortemente as características deste polissacarídeo (Dash *et al.*, 2011). O grau de desacetilação (DD) corresponde à quantidade de grupos amino ao longo da cadeia e é definido pela razão entre os grupos glicosamina e a soma de N-acetil-glicosamina e glicosamina. Para que seja considerado como quitosana, o polímero deve apresentar no mínimo 60% de desacetilação, sendo tipicamente utilizados polímeros com grau de desacetilação entre 70% e 95% (Hamman, 2010; Croisier e Jérôme, 2013).

Na Figura 2.4 são mostradas as estruturas químicas da quitosana e da quitina e na Tabela 2.1 a relação do grau de desacetilação e da massa molar com algumas propriedades da quitosana.

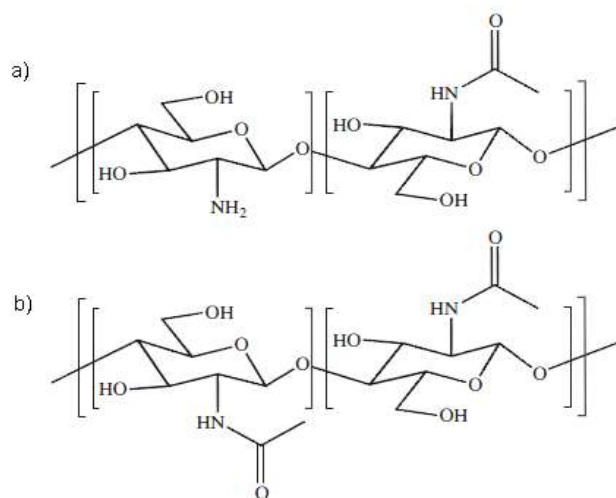


Figura 2.4: Representação das estruturas da quitosana (a) e da quitina (b) (Croisier e Jérôme, 2013).

A quitosana é biodegradável, sendo que sua degradação se dá no organismo pela ação de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas de sua estrutura. As principais enzimas envolvidas na degradação da quitosana são a lisozima e também outras enzimas bacterianas presentes no cólon. Quando degradada, ocorre a formação de oligossacarídeos não tóxicos que são incorporados às rotas metabólicas e excretados normalmente pelo corpo (Guarino *et al.*, 2015).

A quitosana é biocompatível, solúvel em soluções aquosas de ácidos diluídos e apresenta propriedades antimicrobianas e hemostáticas, sendo capaz de estimular o processo de cicatrização e a reorganização da histoarquitetura das células (Croisier e Jérôme, 2013). Devido a estas características, o uso da quitosana combinada com diferentes compostos (geralmente polímeros sintéticos e proteínas) para a produção de substitutos vasculares e outros dispositivos relacionados tem sido intensamente estudado (Azevedo *et al.*, 2013; Chudobova *et al.*, 2013; Jana e Zhang, 2013; Wang *et al.*, 2013a; Wang *et al.*, 2013b; Wang *et al.*, 2013c; Yin *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Zitka *et al.*, 2013).

Tabela 2.1: Relação entre propriedades e características estruturais da quitosana, referentes a seu grau de desacetilação (DD) e massa molar (MM) (adaptado de Dash *et al.*, 2011).

Propriedade	Características estruturais
Solubilidade	↑ DD
Cristalinidade	↓ DD
Biodegradabilidade	↓ DD, ↓ MM
Viscosidade	↑ DD
Biocompatibilidade	↑ DD
Bioadesividade	↑ DD, ↑ MM
Analgesica	↑ DD
Antimicrobiana	↑ DD, ↑ MM
Antioxidante	↑ DD, ↓ MM
Hemostática	↑ DD
↑ = Diretamente proporcional à propriedade	
↓ = Inversamente proporcional à propriedade	

O pKa da quitosana é de cerca de 6,5, ou seja, abaixo deste pH ocorre a protonação de grupos amino, que leva a uma predominância de cargas positivas no polímero. Dessa forma, a

quitosana é capaz de interagir com polímeros e outras espécies negativamente carregadas formando os chamados complexos polieletrólitos (PECs) (Dash *et al.*, 2011). Os poliânions comumente utilizados para complexação com a quitosana são polissacarídeos contendo grupos carboxílicos, como o alginato, a pectina e a goma xantana. Os PECs podem ser mecanicamente reforçados pela adição de agentes que promovam a formação de sistemas reticulados, como é o caso de íons bivalentes, que tem a capacidade de induzir a reticulação de cadeias de alginato ou pectina, por exemplo (Berger *et al.*, 2004). Dentre os fatores que afetam a formação de um PEC podem ser listados o pH, temperatura, força iônica e sequência de mistura das soluções poliméricas. Além disso, a flexibilidade dos polímeros, sua massa molar, grau de desacetilação da quitosana, e grau de substituição do outro polieletrólito podem também impactar nas propriedades finais do complexo. Mais especificamente, a massa molar e o grau de desacetilação da quitosana determinam a densidade de cargas deste polímero e, como mencionado anteriormente, afetam diretamente suas propriedades químicas e biológicas, bem como as propriedades dos PECs resultantes (Dash *et al.*, 2011; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). As propriedades individuais dos polímeros também se alteram quando o PEC é formado. A característica hemostática da quitosana, por exemplo, é praticamente eliminada quando esta é complexada, devido a interações de seus grupos amino com os grupos funcionais do outro polímero (Rodrigues *et al.*, 2008).

2.6.2. Alginato

O alginato é um polissacarídeo aniônico linear derivado de algas marrons, cuja massa molar varia de 32 a 400 kDa. Este biopolímero vem sendo amplamente estudado e aplicado na área médica por apresentar baixa toxicidade, alta biocompatibilidade, baixo custo e capacidade de formação de gel (Lee e Mooney, 2012). Sua estrutura química, mostrada na Figura 2.5, é composta de dois tipos de subunidades repetitivas denominadas β -(1,4)-D-manuronato (grupo M) e α -(1,4)-L-guluronato (grupo G), que se dispõem alternadamente na cadeia polimérica em blocos contendo grupos G, M ou M-G (Gombotz e Wee, 1998; Haug, 1964).

A gelificação do alginato pode resultar de interações entre grupos G presentes em sua cadeia e íons bivalentes, como o cálcio. As regiões de junção formadas entre pares das cadeias de guluronatos geram cavidades nas quais os cátions se acomodam, fortalecendo a interação desses resíduos. Esta configuração, conhecida como “caixa de ovos”, é ilustrada na Figura 2.6. A

composição (razão entre grupos M/G), a sequência e o tamanho dos blocos, bem como a massa molar da cadeia polimérica afetam as propriedades do alginato e seus hidrogéis (George e Abraham, 2006; Lee e Mooney, 2012).

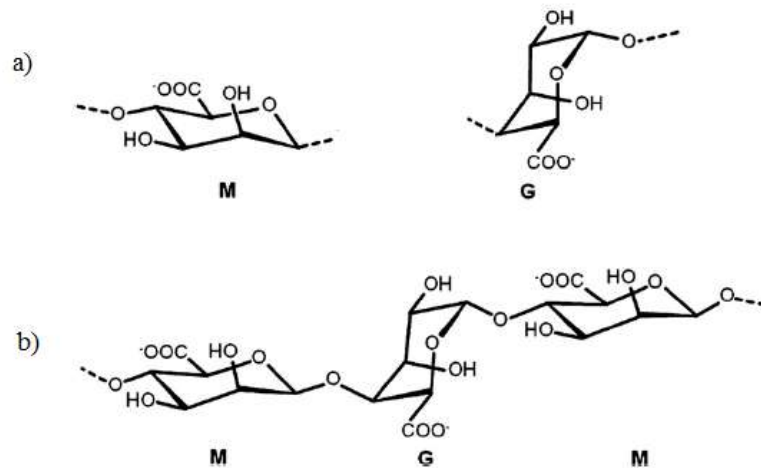


Figura 2.5: Estrutura química do alginato: a) Representação dos blocos M e G constituintes do biopolímero. b) Cadeia de alginato com blocos M e G alternados (adaptado de Lee e Mooney, 2012).

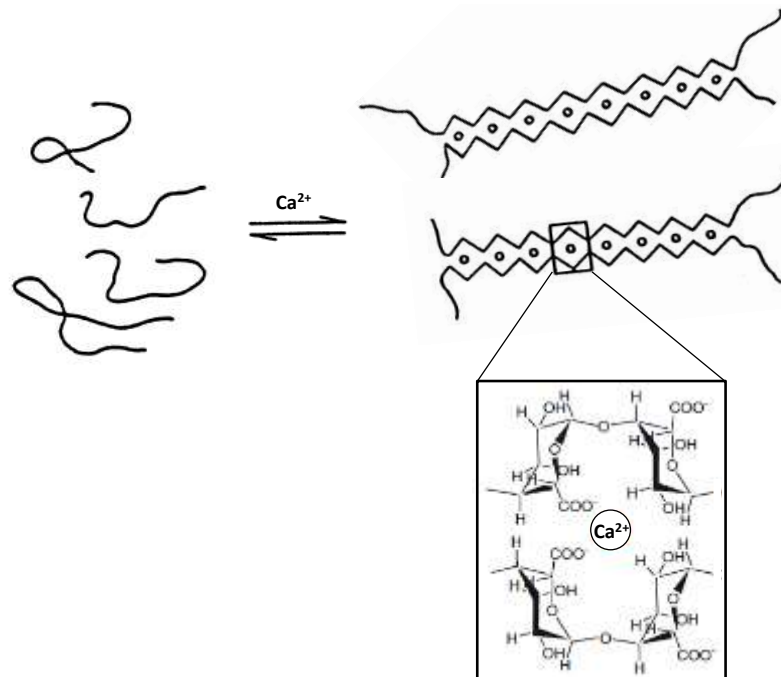


Figura 2.6: Representação esquemática do modelo “caixa de ovos” para o alginato (adaptado de Gombotz e Wee, 1998).

Os resíduos M e G apresentam pKa iguais a 3,38 e 3,65, respectivamente, isto é, em valores de pH acima destes, ocorre desprotonação de grupos carboxila, levando a uma predominância de cargas negativas no polímero e conferindo a ele a capacidade de formar PECs com espécies positivamente carregadas (Meng *et al.*, 2010). A formação dos PECs de quitosana e alginato ocorre pela interação iônica entre os grupos amino da quitosana (positivamente carregados) e grupos carboxila do alginato (negativamente carregados) e os complexos formados mantêm as características de biodegradabilidade e biocompatibilidade observadas para os polímeros isolados (Hamman, 2010). O reforço das propriedades mecânicas dos complexos de quitosana e alginato pode ser feito pela adição à sua estrutura de agentes de reticulação como, por exemplo, os íons cálcio (Berger *et al.*, 2004).

A combinação de quitosana e alginato já é amplamente estudada para aplicação na área médica, sendo muito explorada para a engenharia de tecidos (Bierhalz *et al.*, 2016; Furuya, *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2011; Kumbhar e Pawar, 2017), tais como tecido ósseo (Algul *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005; Sowjanya *et al.*, 2013), neural (Wang *et al.*, 2017) ou vascular (Neufurth *et al.*, 2015; Wilkens *et al.*, 2016), além de cartilagem (Hsu *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2016; Reed e Wu, 2017; Zhao *et al.*, 2014), pele (Bierhalz e Moraes, 2016; Bueno *et al.*, 2014) e tendão (Majima *et al.*, 2005).

2.6.3. *Pectina*

A pectina é um polissacarídeo extraído da parede celular de algumas plantas e do albedo de frutas cítricas (Sriamornsak, 2003). Sua massa molar varia de 50 a 150 kDa, sendo considerado um polímero essencialmente linear, porém composto de vários elementos estruturais cuja combinação leva à arranjos diferentes em regiões distintas da molécula, denominadas regiões lisas (do inglês *smooth regions*) ou regiões em cabeleira (do inglês *hairy regions*) (Sriamornsak, 2003; Kokkonen *et al.*, 2007). As regiões lisas são compostas por resíduos de ácido D-galacturônico com graus de metilação e/ou amidação variados, unidos através de ligações glicosídicas α -1,4. A amidação da pectina é realizada com propósitos comerciais e se dá pela conversão de grupos éster em grupos amida por meio da hidrólise promovida pela presença de amônia. As regiões em cabeleira são constituídas principalmente de unidades de L-ramnose, unidas por ligações α -1,2, que introduzem uma leve torção na cadeia linear da pectina. Essas regiões podem conter também outros açúcares neutros como arabinose, galactose, glucose e

xilose (Kokkonen *et al.*, 2007; Sriamornsak, 2003; Thakur *et al.*, 1997). A estrutura química da pectina é ilustrada na Figura 2.7.

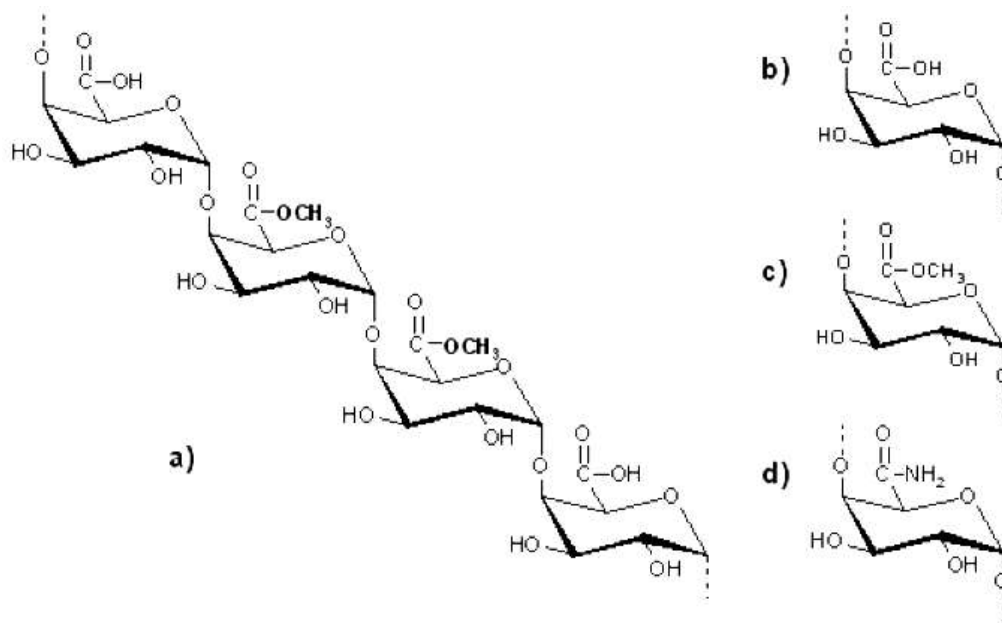


Figura 2.7: Segmento repetitivo na molécula de pectina (a) e grupos funcionais carboxila (b), éster (c) e amida (d) na cadeia de pectina (Sriamornsak, 2003).

A pectina é usualmente classificada quanto ao grau de esterificação com metanol, sendo considerada pectina de baixa metoxilação (PBM) quando abaixo de 50% e como de alta metoxilação (PAM) quando acima de 50% (Sriamornsak, 2003; Sharma *et al.*, 2006). A metoxilação afeta diretamente a capacidade de formação de gel da pectina, sendo que a PAM forma géis em meio ácido, com a adição de açúcares como a sacarose e a glicose. Já a PBM forma géis na presença de íons multivalentes, como o cálcio, que promovem a interação entre grupos carboxila de pectinas de cadeias distintas formando a configuração de caixa de ovos, já citada anteriormente. A amidação aumenta ou melhora a capacidade de gelificação da PBM, sendo que pectinas amidadas gelificam na presença de menores quantidades de cálcio e são menos propensas à precipitação na presença de altos níveis deste íon. A presença dos grupos amida altera o mecanismo de gelificação da pectina, que passa a não ocorrer apenas conforme o modelo da caixa de ovos, mas também pela associação de blocos destes grupos através de pontes de hidrogênio, como ilustrado na Figura 2.8 (Sriamornsak, 2003; Espitia, 2014).

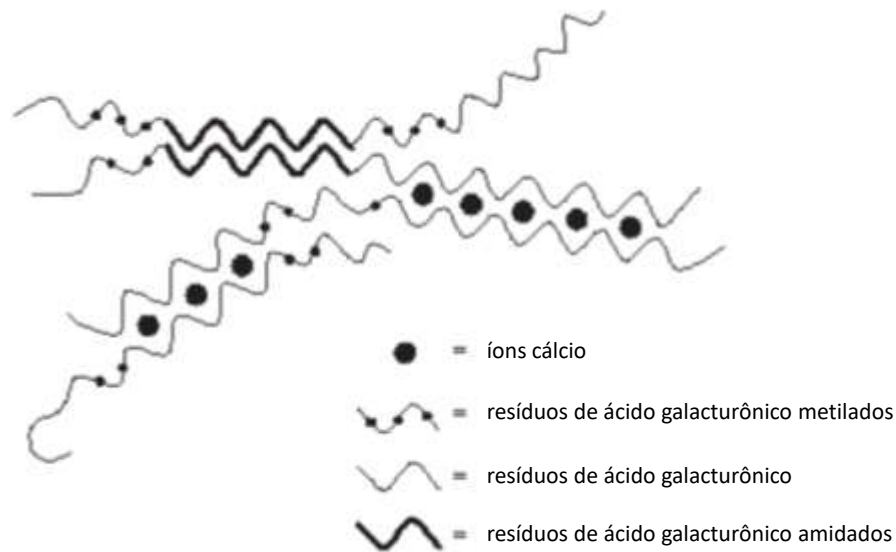


Figura 2.8: Mecanismo de gelificação de pectinas de baixa metoxilação amidadas. Interações iônicas ocorrem entre resíduos de ácido galacturônico e pontes de hidrogênio entre resíduos de ácido galacturônico amidados (adaptado de Sriamornsak, 2003).

Diferentes composições das cadeias laterais, extensão das ramificações, massa molar e o grau de esterificação e amidação da pectina influenciam fortemente as propriedades físico-químicas deste polissacarídeo (Kokkonen *et al.*, 2007).

O pKa da pectina varia entre 4,1 e 5,5, dependendo de seu grau de esterificação (Sriamornsak, 2003). Logo, em valores de pH maiores que estes, ocorre a desprotonação de grupos carboxilas na estrutura da pectina, o que leva a uma predominância de cargas negativas no polímero e possibilita sua complexação com a quitosana por meio de interações eletrostáticas (Tsai *et al.*, 2014).

Hidrogéis produzidos com pectina são muito estudados para utilização na área médica devido às suas propriedades físico-químicas facilmente ajustáveis à aplicação, elevada capacidade de retenção de água e possibilidade de atuar como carreadores de proteínas, fármacos ou células (Munarin *et al.*, 2012). Além disso, o desenvolvimento de materiais constituídos de pectina combinada com quitosana também destinados a este tipo de aplicação é bem estabelecido (Bernabé *et al.* 2005; Martins *et al.*, 2018a), principalmente para a liberação controlada de fármacos (Ghaffari *et al.*, 2007; Bigucci *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2013; Maciel *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2017). No entanto, materiais constituídos de quitosana e pectina não são muito explorados para a aplicação na engenharia de tecidos, especificamente, e apenas poucas publicações

direcionadas a este fim podem ser localizadas na literatura (Coimbra *et al.*, 2011; Archana *et al.*, 2013; Liu, *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2018b).

Os dispositivos produzidos pela combinação tanto da pectina como do alginato com a quitosana geralmente possuem maior capacidade de absorção de soluções aquosas e estabilidade em faixas de pH maiores do que aqueles produzidos apenas com quitosana. Em geral, estes biomateriais apresentam estruturas pouco porosas, o que dificulta a acomodação de células em seu interior, e geralmente apresentam baixa resistência mecânica, especialmente no que se refere ao alongamento na ruptura (Bueno e Moraes, 2011; Veiga, 2012; Souza *et al.*, 2017). A importância e as formas de se contornar tais limitações são discutidas a seguir.

2.7. Estratégias para a obtenção de *scaffolds* porosos e com melhores propriedades mecânicas

2.7.1. Porosidade

A porosidade é um fator determinante no sucesso do substituto vascular quando este é implantado. Um *scaffold* com porosidade adequada, no que diz respeito ao tamanho, distribuição e interconectividade dos poros, permite o transporte eficiente de nutrientes e metabólitos, levando a uma melhor adesão e proliferação de células endoteliais e angiogênese (Ahmed *et al.*, 2011).

Diversos métodos são utilizados para a obtenção de *scaffolds* porosos. Dentre eles, podem ser citados como exemplos os métodos de electrospinning, freeze-drying e solvent casting com a introdução de agentes porogênicos (Okamoto e John, 2013). O electrospinning consiste basicamente na formação de micro ou nanofibras a partir de uma solução polimérica pela aplicação de uma diferença de potencial e formação de um jato fluido, que é coletado em um anteparo. O método de freeze-drying, ou liofilização, é uma tecnologia que consiste na remoção de água de um material através da sublimação. Os poros são formados nos locais onde havia moléculas de água na estrutura polimérica. Já no método de solvent casting, ou moldagem por evaporação do solvente, adiciona-se à solução polimérica formadora da matriz um agente porogênico, que pode ser tanto um sal (método de salt leaching), que é depois arrastado da matriz pelo uso de um solvente que não a dissolve, formando os poros, ou então um tensoativo (formador de espuma) (Okamoto e John, 2013; Lu *et al.*, 2013).

O composto Kolliphor[®] P188 é um agente porogênico que já vem sendo utilizado no grupo de pesquisas da Prof. Dra. Ângela Maria Moraes em formulações de membranas

polissacarídicas produzidas pelo método de evaporação do solvente e voltadas para a aplicação no tratamento de lesões de pele (Bueno e Moraes, 2011; Bellini *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2014, Bierhalz e Moraes, 2016; Bierhalz *et al.*, 2016). O Kolliphor® P188 é um tensoativo não iônico da classe dos Pluronic ou Poloxamers, com massa molar média de 8350 g/mol. Sua estrutura química, mostrada na Figura 2.9, consiste de um bloco central de polioxipropileno, de caráter relativamente hidrofóbico, cercado dos dois lados por blocos relativamente hidrofílicos de polioxietileno (Bueno, 2010). Os Poloxamers são de grande interesse nas áreas médica e farmacêutica devido a sua baixa toxicidade e imunogenicidade (Patel *et al.*, 2007), bem como seu caráter anfifílico e termorreversibilidade que o tornam atrativos para o uso em diversas formulações (Bueno, 2010; Manoli e Avranas, 2013).

A adição do tensoativo Kolliphor® P188 a uma mistura polimérica resulta na formação de espuma, pela incorporação de ar na matriz, dando origem a uma estrutura estável, conforme descrito por Bueno (2010). A autora estudou os efeitos da adição deste tensoativo a misturas poliméricas de quitosana e alginato e relatou em seu trabalho o mecanismo de formação de poros resultante da adição deste composto ao sistema. Bueno (2010) descreveu a interação de cadeias poliméricas solubilizadas no filme líquido com o tensoativo, presente tanto na forma de micelas quanto de moléculas isoladas. Devido ao seu caráter anfifílico, essas moléculas interagem também com o ar, permanecendo na interface entre ar e líquido. A viscosidade do sistema aumenta devido à interação das cadeias poliméricas com o tensoativo, acarretando numa maior estabilidade da espuma formada. O colapso do filme líquido é impedido devido ao efeito estérico decorrente do elevado tamanho das cadeias poliméricas. Assim, a espuma formada mantém sua integridade estrutural e o material obtido após evaporação do solvente é altamente poroso. Em decorrência da evaporação do solvente durante a produção da matriz, a força iônica e a concentração do tensoativo aumentam, ocasionando mudanças na forma de interação do Poloxamer com os polímeros ao longo do processo.

Bueno *et al.* (2014) produziram membranas de quitosana e alginato contendo Pluronic F68® (equivalente ao Kolliphor® P188) e constataram que estas, por apresentarem aspecto poroso e lamelar, além de ausência de citotoxicidade, seriam adequadas à aplicação como *scaffolds* na engenharia de tecidos. No entanto, apesar de as membranas terem sido consideradas satisfatórias do ponto de vista de seu aspecto e maleabilidade, sua resistência mecânica e alongamento na ruptura foram baixos.

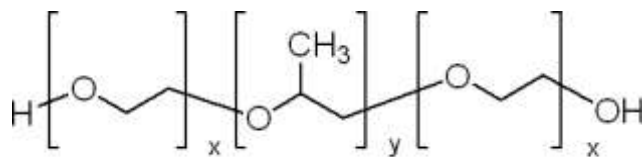


Figura 2.9: Estrutura química do Kolliphor® P188, sendo $x = 80$ e $y = 27$ (Bueno, 2010).

Bueno *et al.* (2014) produziram membranas de quitosana e alginato contendo Pluronic F68® (equivalente ao Kolliphor® P188) e constataram que estas, por apresentarem aspecto poroso e lamelar, além de ausência de citotoxicidade, seriam adequadas à aplicação como *scaffolds* na engenharia de tecidos. No entanto, apesar de as membranas terem sido consideradas satisfatórias do ponto de vista de seu aspecto e maleabilidade, sua resistência mecânica e alongamento na ruptura foram baixos.

É importante ressaltar que deve haver um compromisso entre a porosidade do *scaffold* e sua resistência mecânica, de modo que a estrutura deve ser porosa o suficiente para permitir os benefícios que esta característica traz às células, mas sem comprometer a estabilidade mecânica do dispositivo (Chan e Leong, 2008). Tendo isso em vista, são necessárias estratégias para adequar as propriedades mecânicas dos *scaffolds* às necessidades de sua aplicação na engenharia de tecidos vasculares.

2.7.2. *Propriedades mecânicas*

A falta de compatibilidade mecânica do substituto vascular com o tecido nativo é uma das principais causas das complicações atreladas ao uso destes dispositivos. Características mecânicas do substituto vascular, como sua compliância e módulo de elasticidade influenciam diretamente na sua patência, isto é, sua capacidade de permanecer desobstruído. A compliância mecânica do vaso sanguíneo é uma propriedade que expressa a alteração de suas dimensões em função da pressão em seu interior, enquanto que o módulo de elasticidade é definido como a razão entre a tensão aplicada no material e a respectiva deformação nele causada. A incompatibilidade destas propriedades do material com as do tecido vascular nativo acarreta em alterações na tensão de cisalhamento na parede dos vasos sanguíneos, que podem induzir problemas como a hiperplasia intimal, causando assim a oclusão e consequente falha do dispositivo (Salacinski *et al.*, 2001). Esses problemas estão relacionados à transferência, para o nível celular, dos efeitos biomecânicos do fluxo sanguíneo sobre o vaso, de acordo as

propriedades viscoelásticas intrínsecas do material que constitui o *scaffold*. Logo, a compliância e a elasticidade do material podem afetar significativamente o fenótipo e a proliferação de células vasculares aderidas à superfície do dispositivo e também envolvidas no processo de regeneração do tecido. Há, portanto, uma relação entre a atividade celular e as propriedades viscoelásticas do material implantando nas condições de fluxo sanguíneo (Ucuzian e Greisler, 2011).

Os vasos sanguíneos nativos possuem caráter viscoelástico e são capazes de adaptar o seu diâmetro de forma a manter uma tensão de cisalhamento na parede relativamente constante (Salacinski *et al.*, 2001). A obtenção de substitutos vasculares que mimetizem esta habilidade é, no entanto, extremamente difícil (Ucuzian e Greisler, 2011). A seguir serão discutidas abordagens que podem ser utilizadas para conferir aos *scaffolds* o caráter de elasticidade e resistência mecânica desejados.

Chen *et al.* (2013) exemplificam uma série de elastômeros que podem ser utilizados na engenharia de tecidos, de forma a tornar os *scaffolds* mecanicamente mais compatíveis com os tecidos nativos. Dentre os compostos citados pelo autor estão polímeros naturais, como os polihidroxicanoatos, proteínas, como o colágeno, a elastina e a fibrina, e polímeros sintéticos, como os poliuretanos, a policaprolactona e os silicones.

Os silicones são constituídos de uma cadeia principal de átomos de oxigênio ligados a átomos de silício, sendo que estes últimos também se ligam a grupos orgânicos, tipicamente grupos metil. O polidimetilsiloxano (PDMS) é o mais comum dentre os silicones e sua estrutura é mostrada na Figura 2.10 (Colas e Curtis, 2013).

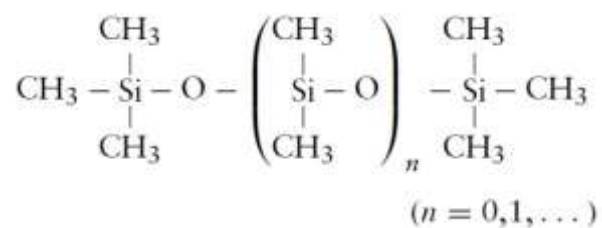


Figura 2.10: Estrutura química dos silicones da classe do polidimetilsiloxano (Colas e Curtis, 2013).

Os polímeros de silicone podem ser facilmente transformados em redes tridimensionais pela reticulação por ligações químicas entre cadeias adjacentes. Este processo

caracteriza a formação de um elastômero e pode ocorrer de várias maneiras, incluindo a reticulação por adição. Nesta condição, a reticulação é obtida pela reação entre polímeros de silicone com grupos vinil terminais (Si–Vi) e oligômeros funcionais contendo grupos Si–H, na presença de um catalisador metálico, como platina ou ródio. A reação ocorre como mostrado na Figura 2.11. Geralmente dois componentes distintos são misturados para que a cura do PDMS ocorra, sendo que um componente é constituído do polímero Si–Vi e do catalisador de platina e o outro do polímero Si–Vi e do oligômero Si–H (Colas e Curtis, 2013).

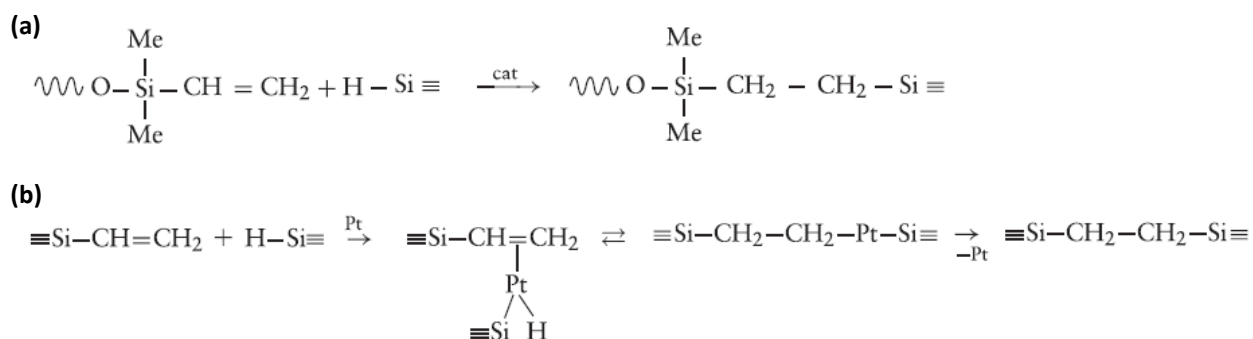


Figura 2.11: Reação de adição para reticulação do PDMS e formação de elastômero de silicone (a). Mecanismo de da atuação do catalisador de platina na reação de adição (b). O símbolo $\equiv$ representa outras ligações realizadas pelo átomo de silício (adaptado de Colas e Curtis, 2013).

O Silpuran[®] 2130 A/B é um elastômero de silicone que se caracteriza por sua biocompatibilidade, baixa viscosidade, transparência, hidrofobicidade, não-toxicidade e estabilidade à esterilização com óxido de etileno (Pires, 2013; Wacker Chemie, 2018). Este composto já vem sendo utilizado pelo grupo de pesquisa da Prof. Dra. Ângela Maria Moraes como uma forma de se promover a melhoria das propriedades mecânicas de membranas constituídas de quitosana e alginato aplicadas no tratamento de lesões de pele (Pires e Moraes, 2015).

A reticulação do Silpuran[®] 2130 A/B ocorre por adição. Tanto o componente A quanto o B contêm grupos funcionais e agentes auxiliares para reticulação aditiva, sendo que o catalisador de platina está presente no componente A (Wacker Chemie, 2018).

Pires e Moraes (2015) observaram significativo aumento da resistência mecânica, no que diz respeito à tensão e alongamento na ruptura, em filmes constituídos de quitosana e

alginate na presença do Silpuran[®] 2130 A/B em relação a filmes aos quais este composto não havia sido incorporado. A tensão na ruptura das membranas aumentou de aproximadamente 20 MPa em membranas isentas do composto siliconado para 63 MPa em membranas nas quais o composto foi incorporado. O aumento também foi observado para o alongamento na ruptura dos filmes, que passou de aproximadamente 2,7% para 5,1% em membranas com o silicone.

Uma desvantagem do uso de silicones na engenharia de tecidos é que estes compostos não são biodegradáveis. No entanto, são biologicamente inertes e não-tóxicos quando usados em pequenas quantidades (Chen *et al.*, 2013), como seria o caso na sua aplicação neste trabalho. Levando-se em conta também que o uso interno destes compostos já é bem estabelecido, como no caso de implantes estéticos, por exemplo, consideramos que seu uso para a aplicação desejada no presente trabalho não traria problemas.

Capítulo 3:

METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo, dividido em quatro seções, é apresentada a metodologia experimental empregada em cada etapa do trabalho, bem como os resultados gerados por meio dos ensaios realizados e sua discussão, considerando os objetivos específicos do estudo e a literatura consultada. Na primeira seção, testes preliminares para a determinação da metodologia a ser utilizada na produção de matrizes poliméricas de geometrias plana e tubular à base de polissacarídeos são mostrados. Já as seções 3.2 a 3.4, apresentadas em inglês, correspondem a três artigos científicos redigidos para publicação em periódicos internacionais indexados, tendo sido o primeiro deles publicado no veículo indexado *International Journal of Biological Macromolecules*, o segundo na revista *Materials Science and Engineering C* e o terceiro no *Journal of Applied Polymer Science*.

Tendo em vista que um grande número de formulações foi estudado neste trabalho, o diagrama mostrado na Figura 3.1 foi construído a fim de facilitar a compreensão da composição dos *scaffolds* pelo leitor.

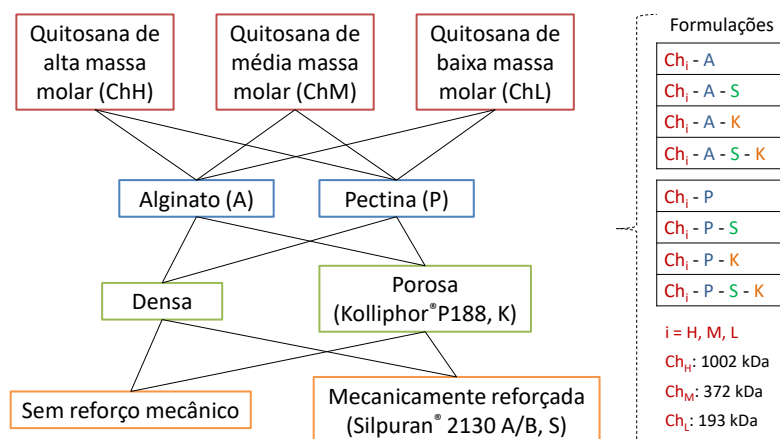


Figura 3.1: Diagrama da composição das formulações de *scaffolds* estudadas neste trabalho.

Além disso, visando fornecer uma visão mais abrangente da estruturação do trabalho, apresenta-se na Figura 3.2 um fluxograma que sumariza as caracterizações apresentadas em cada seção. As metodologias utilizadas para cada caracterização estão descritas nas respectivas seções onde foram empregadas. Tendo em vista que algumas das metodologias tiveram sua descrição feita de forma concisa nos artigos, estas foram mais detalhadamente descritas nos Apêndices. A

avaliação das propriedades mecânicas dos *scaffolds* por ensaios de relaxação de forças de tensão e compressão, apresentada nas seções 3.2 a 3.4, é detalhada no Apêndice A, e o preparo de gel de colágeno celularizado, abordado na seção 3.4, é descrito com mais detalhes no Apêndice B.

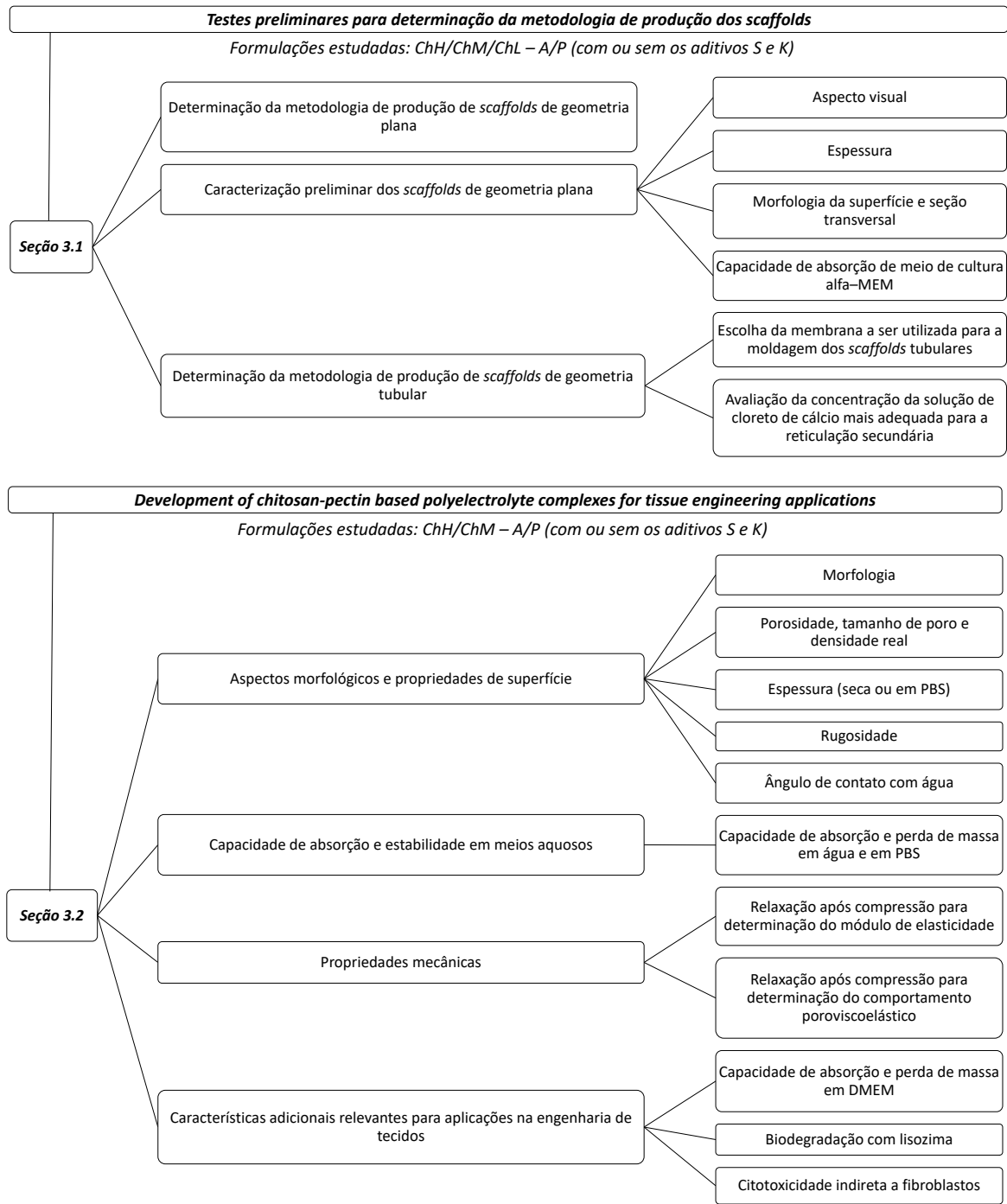


Figura 3.2: Fluxograma representando a estruturação da apresentação dos resultados (*continua*)

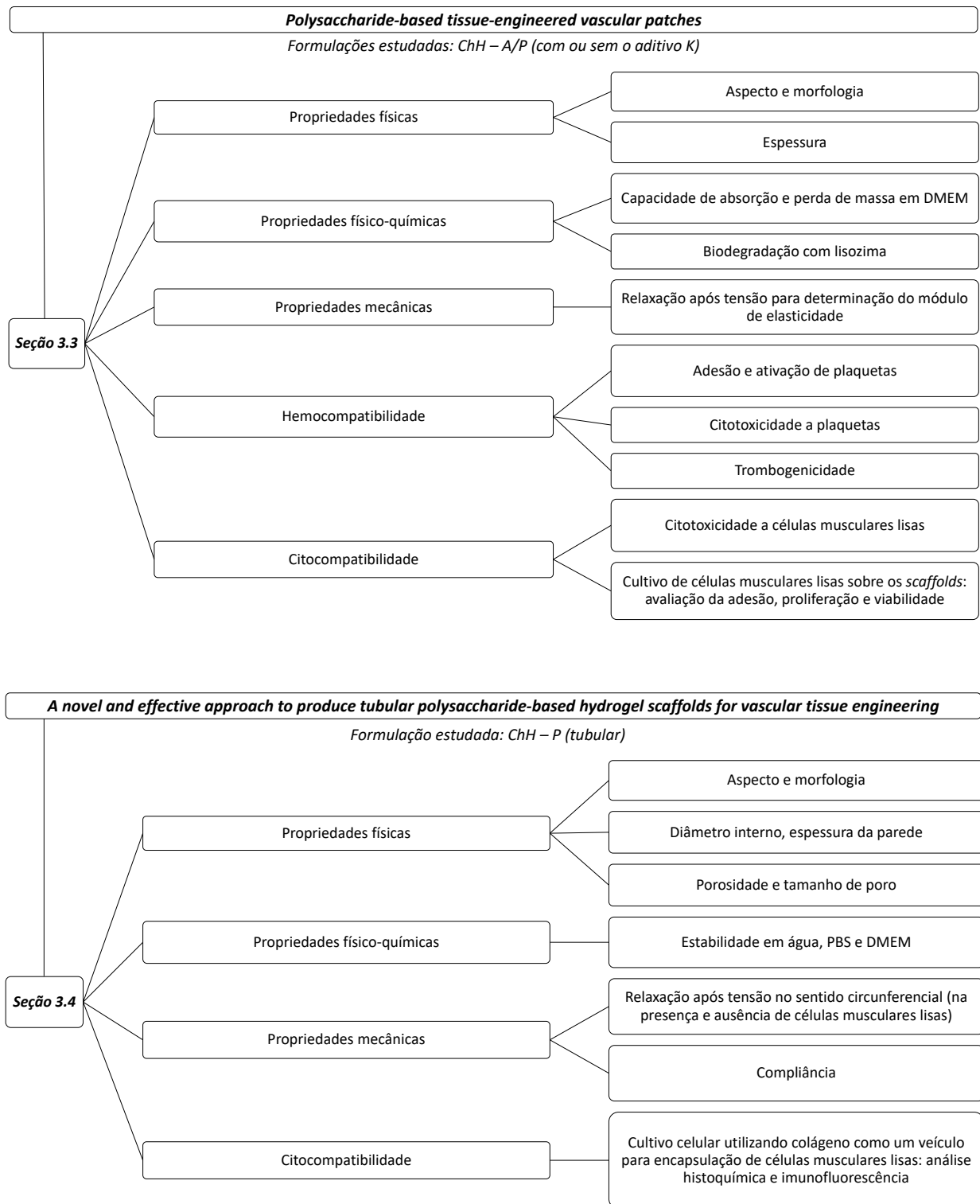


Figura 3.2: (continuação) Fluxograma representando a estruturação da apresentação dos resultados.

3.1. TESTES PRELIMINARES PARA OBTENÇÃO DE *SCAFFOLDS* PLANOS OU TUBULARES

Nesta seção são apresentados os estudos preliminares realizados a fim de se estabelecer a metodologia de preparação de *scaffolds* de geometria plana ou tubular à base de quitosana complexada com outros polissacarídeos.

Para os *scaffolds* de geometria plana, usaram-se como base metodologias já estabelecidas e utilizadas para a obtenção de membranas polissacarídicas no grupo da Prof. Dra. Ângela Maria Moraes, que tem como princípio o uso do método de evaporação do solvente (em inglês *solvent casting*) para a moldagem de matrizes poliméricas. Inicialmente, quitosanas de três diferentes massas molares e também uma quitosana de grau farmacêutico foram testadas para obtenção de matrizes planas. Os resultados e discussões apresentados nesta seção visam à comparação das propriedades de matrizes obtidas por combinações das diferentes quitosanas com alginato ou pectina. As caracterizações preliminares do material produzido levaram à exclusão das formulações com características não adequadas à aplicação proposta como *scaffolds* na engenharia de tecidos.

Os *scaffolds* de geometria tubular foram produzidos a partir de uma nova metodologia proposta neste trabalho, que se baseia na moldagem de uma solução polimérica de quitosana complexada com pectina pela reticulação controlada com íons cálcio dos poliânions, mediada por uma membrana semipermeável. Um estudo acerca do tipo de membrana utilizada para a moldagem dos tubos e da concentração da solução de cloreto de cálcio mais adequada para reticulação foi realizado e os resultados são mostrados nesta seção.

3.1.1. *Materiais*

Para a obtenção dos *scaffolds* foram utilizados os seguintes reagentes, de qualidade analítica certificada: quitosana de carapaça de crustáceos de alta massa molar (ChH, produto com código 419419, lote MKBP1333V, grau de desacetilação, DD, de 76 % e massa molar viscosimétrica, M_v , de 1002 kDa), quitosana de média massa molar (ChM, produto com código 448877, lote SLB47490V, DD de 81 % e M_v de 372 kDa), quitosana de baixa massa molar (ChL, produto com código 448869, lote SLBJ5775V, DD de 93,1% e M_v de 193 kDa), alginato de média viscosidade de algas marrons (A, produto com código A2033, lote 058K0126, viscosidade

de 2900 cps a 2% e 25 °C, razão M/G de 1,56 e M_v de 94 kDa), pectina de casca de frutas cítricas (P, produto com código P9135, lote SLBN9007V, conteúdo de ácido galacturônico de 80,2 %, grau de metoxilação de 7,6 % e M_v de 46 kDa) e agente tensoativo Kolliphor® P188 (K, produto com código P1300) fornecidos pela Sigma-Aldrich Co. Foram utilizados também quitosana de grau farmacêutico (ChF) da Fagron (massa molar indeterminada), ácido acético glacial da Synth, cloreto de cálcio dihidratado e hidróxido de sódio da Merck & Co. Inc. e gel à base de silicone Silpuran® 2130 A/B (S) da Wacker Chemie AG. A água utilizada nos ensaios foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q® da Millipore. A massa molar dos polissacarídeos ChH, ChM, ChL, A e P foi determinada pelo método viscosimétrico e o procedimento é detalhado no Apêndice C.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Determinação da metodologia de produção de scaffolds de geometria plana

A preparação dos *scaffolds* de quitosana combinada com outros polissacarídeos teve como base os procedimentos desenvolvidos por Rodrigues *et al.* (2008), Veiga (2012), Bueno *et al.* (2014) e Pires e Moraes (2015). As autoras obtiveram membranas finas, flexíveis ou porosas de composição semelhante àquela desejada para os *scaffolds* produzidos no presente trabalho.

O estabelecimento da metodologia de preparação dos *scaffolds* foi realizado em duas etapas. A primeira etapa, ou etapa teste, foi realizada com o objetivo de avaliar a capacidade dos polímeros de interagir e formar complexos resultando em filmes íntegros e de aspecto visual satisfatório. Esta etapa foi feita em pequena escala a fim de se reduzir o consumo de material necessário para os testes preliminares. As concentrações e volumes das soluções poliméricas utilizadas, bem como as proporções do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B e do tensoativo Kolliphor® P188 empregados na preparação dos *scaffolds* densos e porosos de geometria plana foram determinados conforme valores já estabelecidos nas referências anteriormente citadas.

Na etapa teste, placas de 6 poços (Corning, poços de 3,5 cm de diâmetro) foram utilizadas para moldagem dos filmes, logo, volumes proporcionalmente equivalentes àqueles usados pelas referidas autoras, que fizeram a moldagem em placas de Petri de diâmetro 15 cm, foram utilizados.

Para preparação dos *scaffolds* de quitosana e alginato (Ch-A) em pequena escala, 4,9 mL de uma solução de quitosana (solução aquosa de ácido acético a 1% v/v) na concentração

de 1% (m/v) foram adicionados com uma pipeta a 9,8 mL de uma solução de alginato (solução aquosa) a 0,5% (m/v) contida em um tubo de ensaio. Para as formulações contendo o tensoativo Kolliphor® P188, 4,9 mg deste composto, o equivalente a 10% (m/m) em relação à massa total dos polímeros Ch e A, foram adicionados à solução de alginato previamente à adição da quitosana. A agitação foi feita por meio de um agitador de tubos tipo vortex (AP56, Phoenix) durante todo o período em que a quitosana estava sendo adicionada e permaneceu por mais 2 minutos além deste tempo. Em seguida, adicionou-se solução aquosa de NaOH 2M para correção do pH para 7, sob agitação constante. Após 2 minutos, adicionou-se 5,1 µL de Silpuran® 2130 A e 5,1 µL de Silpuran® 2130 B (nas formulações que o continham), o equivalente a 10% (m/m) em relação à massa total dos polímeros Ch e A, considerando a densidade do Silpuran igual a 0,97 g/mL. Novamente após 2 minutos, adicionou-se 196 µL de solução aquosa de CaCl₂ 2% (m/v) como agente reticulante. A mistura obtida foi vertida em dois dos poços da placa de 6 poços e colocada em estufa a 37°C por 12 horas para evaporação do solvente. Após a secagem, cada filme foi imerso por 10 minutos em 10 mL de CaCl₂ a 2%, e duas vezes por 10 minutos em água deionizada. A secagem final foi realizada a temperatura ambiente.

Para preparação dos filmes de quitosana e pectina (Ch-P) em pequena escala procedimento semelhante foi utilizado, no entanto, não aconteceram neste caso as etapas de ajuste do pH e reticulação, conforme Veiga (2012), que observou que a presença destas etapas não resultava na formação de filmes íntegros. Com uma pipeta, 4,9 mL de uma solução de quitosana (solução aquosa de ácido acético a 1% v/v) na concentração de 1% (m/v) foram adicionados a 2,45 mL de uma solução de pectina (solução aquosa) a 2% (m/v) contida em um tubo de ensaio. Para as formulações contendo o tensoativo Kolliphor® P188, 9,8 mg deste composto, o equivalente a 10% (m/m) em relação à massa total dos polímeros Ch e P, era adicionado à solução de pectina previamente à adição da quitosana. A agitação foi feita por meio de um agitador de tubos tipo vortex (AP56, Phoenix) durante todo o período em que a quitosana estava sendo adicionada e permaneceu por mais 2 minutos além deste tempo. Em seguida, adicionou-se 5,1 µL de Silpuran® 2130 A e 5,1 µL de Silpuran® 2130 B (nas formulações que o continham), o equivalente a 10% (m/m) em relação à massa total dos polímeros Ch e P. A mistura obtida foi vertida em um dos poços da placa de 6 poços e colocada em estufa a 37° C por 12 horas para evaporação do solvente. Após a secagem, cada filme foi imerso duas vezes por 10 minutos em água deionizada. A secagem final foi realizada a temperatura ambiente.

Nesta etapa foram avaliadas as quitosanas de alta, média e baixa massa molar, bem como a quitosana de grau farmacêutico para complexação com o alginato de média viscosidade e a pectina de baixa metoxilação.

Na etapa seguinte, em escala ampliada, prosseguiu-se com os testes já realizados, selecionando-se as condições experimentais que apresentaram resultados mais promissores em pequena escala e alterando-se algumas condições que levaram à formação de *scaffolds* de aspecto não desejável.

Para a obtenção dos *scaffolds* de quitosana e alginato em escala ampliada, adicionou-se 180 mL de solução de quitosana 1% (m/v) (solução aquosa de ácido acético a 1% v/v), com auxílio de uma bomba peristáltica (modelo Minipuls 3, Gilson), a 360 mL de solução de alginato (solução aquosa) de concentração 0,5% (m/v), em um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm. Para as formulações contendo o agente porogênico Kolliphor® P188, o composto foi misturado à solução de alginato na proporção de 10% (m/m) previamente à adição da quitosana no reator. A mistura das soluções foi feita a uma vazão de 200 mL/h, sendo o sistema mantido a 25 °C utilizando-se um banho ultratermostático (214 M2, Quimis) e sob agitação constante de 500 rpm empregando-se um agitador mecânico (251 D, Quimis) provido de uma hélice do tipo pás inclinadas de raio 2,1 cm. Ao término da mistura entre as soluções, a taxa de agitação foi aumentada para 1000 rpm e a mistura agitada por mais 10 minutos. A seguir, adicionou-se solução aquosa de NaOH 2M para elevar o pH a aproximadamente 7,0, mantendo-se a agitação do sistema por mais 10 minutos. Após esta etapa foram adicionados 185,5 µL de Silpuran® 2130 A e 185,5 µL de Silpuran® 2130 B à mistura, resultando em uma concentração de 10% (m/m) em relação à massa total de polissacarídeos. Por fim, foram adicionados 7,2 mL de solução de CaCl₂ 2% e o sistema permaneceu sob agitação por mais 10 minutos. O sistema utilizado para a produção do complexo polimérico está ilustrado na Figura 3.3 – a.

Para produção dos *scaffolds* de geometria plana não porosos, a mistura polimérica foi desaerada em bomba de vácuo (Q-355B2, Quimis) por 2 horas. O material resultante foi dividido igualmente em termos mássicos em 4 placas de Petri de poliestireno de 15 cm de diâmetro que foram levadas à estufa com circulação de ar (modelo 410D, Nova Ética) para secagem por 36 horas a 37 °C. Na metade do tempo, os *scaffolds* foram virados na placa de Petri para promover uma secagem mais uniforme. Após a secagem, cada *scaffold* foi imerso por 30 minutos em

150 mL de CaCl_2 a 2% para reticulação secundária e na sequência foram feitas duas imersões de 15 minutos em 200 mL de água deionizada, 30 minutos em 250 mL de tampão HEPES e 30 minutos em 500 mL de água deionizada, visando eliminar resíduos de ácido acético e do tensoativo Kolliphor® P188 remanescentes nos *scaffolds*. A secagem final foi realizada a temperatura ambiente por 24 horas. A representação esquemática das etapas envolvidas no procedimento de fabricação dos *scaffolds* de geometria plana é mostrada na Figura 3.3 – b.

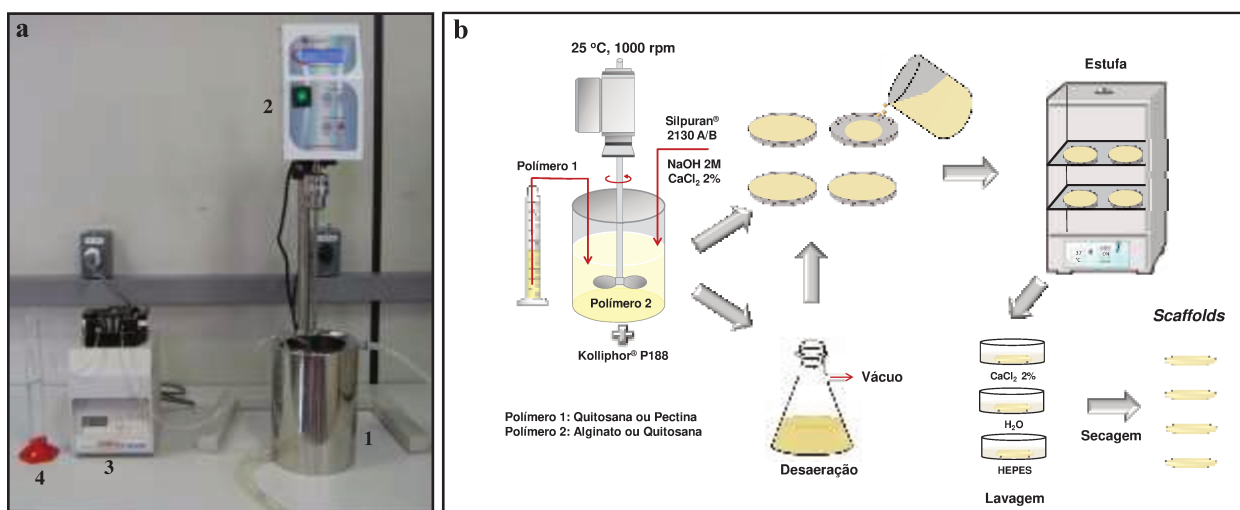


Figura 3.3: (a) Sistema utilizado para a preparação dos *scaffolds*: 1. Reator conectado a banho termostático; 2. sistema de agitação; 3. bomba peristáltica; 4. solução a ser alimentada. (b) Representação esquemática das etapas envolvidas no procedimento de fabricação dos *scaffolds* de geometria plana (Adaptado de Souza, 2018).

Para a obtenção dos *scaffolds* de quitosana e pectina em escala ampliada foram utilizadas soluções de quitosana (solução aquosa de ácido acético a 1% v/v) a 1% (m/v) e de pectina (solução aquosa) a 2% (m/v). O volume empregado foi de 360 mL de solução de quitosana e 180 mL de solução de pectina para uma batelada de 4 *scaffolds*. A princípio, a solução ácida de quitosana foi adicionada a uma vazão de 200 mL/h ao reator contendo a solução de pectina, no entanto, testou-se também a adição da solução de pectina à solução de quitosana. Para as formulações contendo o agente porogênico Kolliphor® P188, o composto foi misturado à solução de pectina, ou de quitosana (a que estivesse dentro do reator, e não sendo adicionada) na proporção de 10% (m/m), previamente à adição da outra solução polimérica ao reator. A

temperatura foi mantida em 25 °C durante todo o processo e o sistema foi mantido sob agitação constante de 1000 rpm. O equipamento utilizado foi o mesmo mostrado na Figura 3.3, porém, neste caso, a hélice para agitação utilizada foi de tipo naval com raio de 2,5 cm. Após completada a mistura dos dois polímeros, esta foi agitada por mais 10 min para que houvesse completa homogeneização. A adição do polímero à base de silicone foi feita na proporção de 10% (v/v) após a formação do complexo entre os dois polissacarídeos, totalizando 371 µL de Silpuran[®] 2130 A e 371 µL de Sipuran[®] 2130 B). Nesta etapa de teste em escala ampliada, foram testados também o ajuste do pH do complexo polimérico de Ch-P para 7,0 e a reticulação primária com 7,2 mL de CaCl₂, analogamente ao procedimento realizado para obtenção dos *scaffolds* de Ch-A. A moldagem dos *scaffolds* de Ch-P por evaporação do solvente e etapas de lavagem para remoção do ácido acético e tensoativo residuais foram feitas conforme descrito para os *scaffolds* de Ch-A.

3.1.2.2. *Caracterização preliminar dos scaffolds de geometria plana*

Aspecto visual: Os *scaffolds* foram inspecionados quanto ao aspecto a olho nu e este foi registrado por fotografias digitais (câmera modelo A410, Canon).

Espessura: As espessuras dos *scaffolds* secos foram medidas com micrômetro Digimess ao longo da sua extensão, calculando-se o valor médio a partir de 10 medidas realizadas em duas diferentes amostras de uma mesma formulação.

Morfologia da superfície e da seção transversal: A morfologia dos *scaffolds* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio (LEO 440, Leica). Para isso, amostras de 2 cm x 1 cm previamente armazenadas em dessecador foram fixadas em um suporte e metalizadas (Sputter coater Polaron SC 7620, Microtech) pela deposição de uma fina camada de ouro (de espessura 92 Å) em suas superfícies. Para a avaliação da seção transversal, as amostras densas foram criofraturadas em nitrogênio líquido e as porosas cortadas com tesoura antes de sua metalização. O uso da tesoura para as amostras porosas foi necessário, pois não foi possível fazer neste caso a criofratura com nitrogênio líquido.

Para as amostras não porosas, os aumentos utilizados foram de 250 vezes para a superfície e 500 vezes para seção transversal. Já para as amostras porosas, ou seja, aquelas contendo o

tensoativo Kolliphor® P188, os aumentos foram de 150 vezes para a superfície e 100 vezes para a seção transversal, a fim de permitir melhor visualização da estrutura porosa formada.

Capacidade de absorção de meio de cultura alfa-MEM suplementado: Amostras dos *scaffolds* de dimensões 1,5 cm x 1 cm, previamente armazenadas em dessecador, foram pesadas (m_{inicial}) e imersas em 4 mL de meio de cultura alfa-MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas a 37 °C. Passado este tempo, o excesso de solvente foi levemente removido com papel de filtro e as amostras foram novamente pesadas em balança analítica para a determinação das massas úmidas finais ($m_{\text{úmida}}$). A capacidade de absorção (CA) da solução foi calculada através da Equação 3.1.

$$CA = \frac{m_{\text{úmida}} - m_{\text{inicial}}}{m_{\text{inicial}}} \quad (3.1)$$

3.1.2.3. Determinação da metodologia de produção de *scaffolds* de geometria tubular

A montagem experimental para preparação de *scaffolds* tubulares consiste em um tubo de polipropileno posicionado no interior de uma membrana semipermeável que contém a solução polimérica de interesse. O conjunto é imerso em uma solução de cloreto de cálcio, a fim de que os íons cálcio atravessem a membrana e promovam a reticulação do alginato ou da pectina presente na mistura polimérica. Dessa forma, o dispositivo permanece na forma em que foi moldado. O procedimento é ilustrado na Figura 3.4.

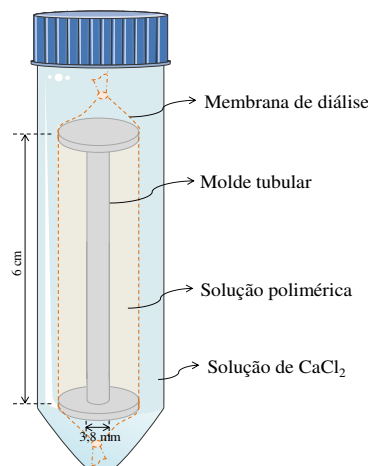


Figure 3.4: Representação esquemática da montagem experimental utilizada para a produção de *scaffolds* tubulares.

Diferentes tipos de membrana semipermeável foram testados para a moldagem dos tubos, incluindo membranas de diálise de celulose regenerada disponíveis comercialmente e adquiridas da Uniscience (Spectra/Por® 3 Dialysis Tubing, com massa molar de corte de 3500 Da e diâmetro de 11,5 mm) e membranas de policaprolactona (PCL) produzidas por eletrofiação nas instalações da própria FEQ/UNICAMP. A metodologia utilizada para a obtenção das membranas de PCL é descrita no Apêndice D.

Para obtenção dos *scaffolds* tubulares, a mistura dos polímeros quitosana e pectina foi preparada com base nos procedimentos utilizados no preparo dos *scaffolds* planos, utilizando-se apenas quitosana de alta massa molar. Nesta etapa, um volume de 60 mL da mistura foi obtido para utilização na moldagem dos tubos. Sendo assim, 40 mL da solução de quitosana de alta massa molar (1% m/v em ácido acético 1% v/v) foram misturados a 20 mL da solução de pectina (2% m/v, solução aquosa). O volume de 2,7 mL de NaOH 2M foi utilizado para neutralização do pH da mistura e 0,8 mL de CaCl₂ 2% foi adicionado para promover a reticulação primária.

A extremidade inferior da membrana, com 12 cm de comprimento, foi fechada com um nó e amarrada com linha de nylon e o molde de polipropileno de 3,8 mm de diâmetro e 6 cm de comprimento foi posicionado em seu interior. Em seguida, 6 mL da mistura quitosana-pectina foram inseridos no interior da membrana com o auxílio de uma seringa conectada a um tubo fino e a extremidade superior da membrana foi fechada da mesma forma.

O conjunto foi imerso em 45 mL de solução de CaCl₂ contidos em um tubo de 50 mL. A fim de se avaliar o efeito da concentração da solução de CaCl₂ na integridade do material obtido, soluções do composto nas concentrações de 2, 7, 12 e 20% (m/v) foram testadas. O sistema foi então levado à geladeira (4 °C) por 48 h, trocando-se a solução de CaCl₂ após 24 h. Finalmente, o sistema foi desmontado e um hidrogel no formato tubular foi obtido. Posteriormente, o material foi congelado em ultrafreezer a -80 °C e liofilizado por 24 horas. O molde de polipropileno foi removido e um *scaffold* tubular altamente poroso foi então obtido.

3.1.2.4. *Caracterização preliminar dos scaffolds de geometria tubular*

Os *scaffolds* tubulares tiveram seu aspecto avaliado quanto à estabilidade estrutural e dimensional por inspeção visual e seu aspecto foi registrado por fotografias digitais, analogamente ao realizado para amostras planas.

3.1.3. Resultados e Discussão

3.1.3.1. Determinação da metodologia de preparação de scaffolds de geometria plana

O aspecto dos *scaffolds* de Ch-A obtidos na etapa teste é mostrado nas Figuras 3.5 e 3.6. Pode-se observar que todas as formulações obtidas com quitosana de alta massa molar resultaram em filmes íntegros, com aspecto variável de acordo com sua composição (Figura 3.5 – a-d). Filmes isentos do tensoativo são densos, enquanto aqueles nos quais o composto foi introduzido se mostram porosos, conforme era esperado. Já para formulações obtidas com quitosana de média e baixa massa molar, nem todos os filmes obtidos se mostraram íntegros, já que alguns deles apresentaram falhas ao longo da matriz formada. No entanto, os resultados observados não foram reproduzíveis entre diferentes bateladas (Figura 3.5 – e-h) e, portanto, optou-se por se repetir os testes em maior escala, mesmo para as formulações que não apresentaram aspecto desejável em pequena escala. As variações entre as bateladas provavelmente foram decorrentes da adição manual da solução polimérica ao tubo de ensaio e da agitação não controlada.

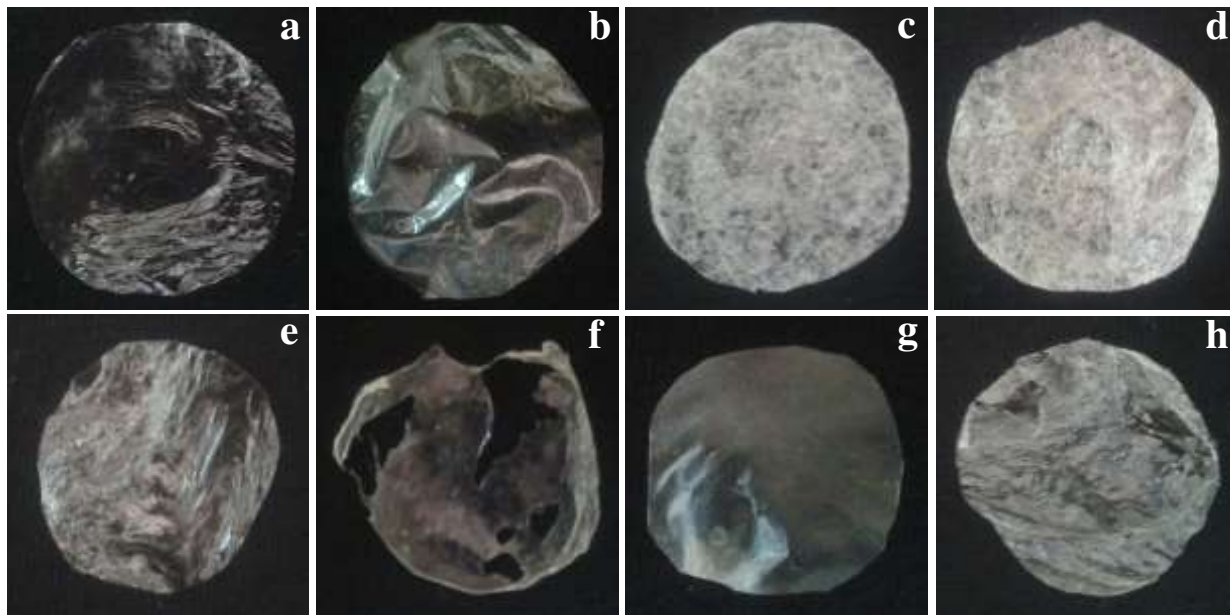


Figura 3.5: Aspecto visual dos *scaffolds* de quitosana e alginato obtidos na etapa teste. Formulações com quitosana de alta massa molar: (a) ChH-A; (b) ChH-A-S; (c) ChH-A-K; (d) ChH-A-S-K; média massa molar: (e) ChM-A, Batelada 1; (f) ChM-A, Batelada 2; e baixa massa molar: (g) ChL-A, Batelada 1; (h) ChL-A, Batelada 2. As amostras têm diâmetro aproximado de 3,5 cm.

As formulações contendo quitosana de grau farmacêutico apresentaram-se íntegras, no entanto acredita-se que o filme formado possa ser constituído majoritariamente de alginato. Na etapa de filtração da solução de quitosana, verificou-se retenção de grande quantidade de resíduo no filtro, embora a quitosana tivesse se solubilizado durante o preparo desta solução, logo, é possível que apenas uma fração da quitosana inicial tenha atravessado o filtro (Figura 3.6). Por este motivo, optou-se pela não utilização da quitosana de grau farmacêutico para os testes em escala ampliada.

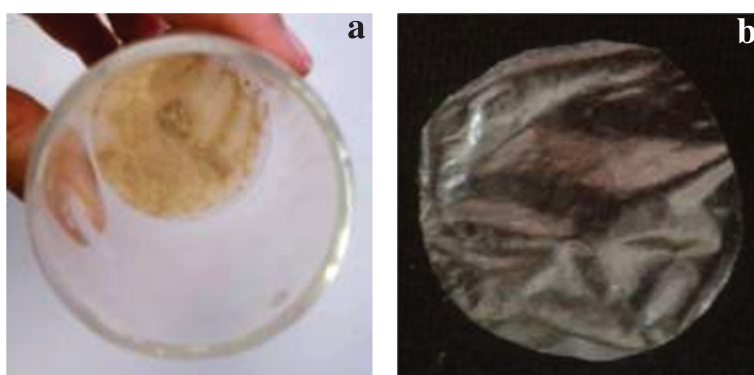


Figura 3.6: (a) Filtro sinterizado utilizado para filtração da solução de quitosana de grau farmacêutico; (b) *Scaffold* obtido utilizando-se quitosana de grau farmacêutico e alginato. A amostra tem diâmetro aproximado de 3,5 cm.

Conforme descrito anteriormente, testes preliminares em escala ampliada foram realizados para a obtenção de *scaffolds* de Ch-A. Os filmes obtidos apresentaram-se íntegros e com aspecto satisfatório e, portanto, não foram feitas alterações na metodologia de preparo empregada. O aspecto dos mesmos será mostrado no item a seguir.

O aspecto dos *scaffolds* de Ch-P obtidos na etapa teste é mostrado na Figura 3.7. Observa-se que nenhuma das formulações resultou na formação de filmes íntegros, provavelmente devido à formação de muitos agregados durante a etapa de mistura polimérica em tubo de ensaio, que mesmo sob forte agitação não se desfaziam. Portanto, a agitação por vortex não foi adequada para a complexação destes polímeros.

A produção de membranas de quitosana e pectina foi, então, testada em escala ampliada, com agitador mecânico do tipo naval, visando promover uma mistura mais eficiente. Apesar de tal medida observou-se ainda a formação de grumos retidos no agitador, ilustrada na

Figura 3.8 – a. Tais agregados, após serem removidos do agitador com uma espátula, desfaziam-se apenas parcialmente após prolongada agitação.

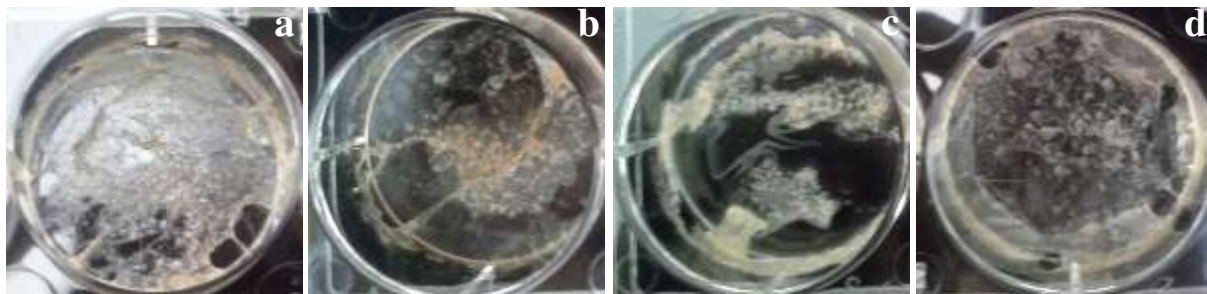


Figura 3.7: Aspecto visual dos *scaffolds* de quitosana e pectina obtidos na etapa teste, em placa de 6 poços. Não houve etapa de lavagem. (a) ChH-P; (b) ChM-P; (c) ChL-P; (d) ChF-P.

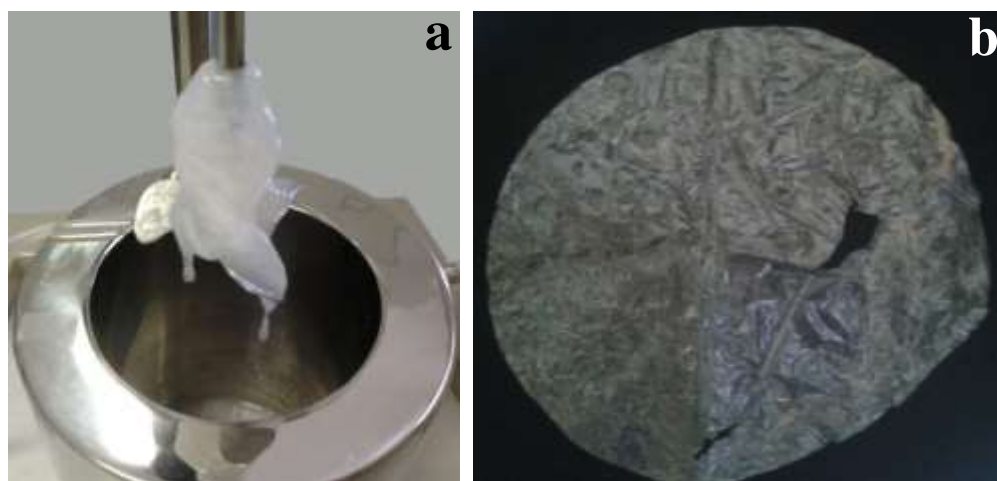


Figura 3.8: (a) Grumo retido no agitador durante a produção da membrana de Ch-P em reator; (b) Aspecto visual do *scaffold* de ChH-P não reticulado e não neutralizado produzido em placa de Petri de 15 cm de diâmetro.

Na tentativa de se reduzir a formação de grumos, testou-se a inversão da ordem de adição dos polímeros, ou seja, a adição da solução de pectina ao reator contendo a solução de quitosana. Observou-se que, de fato, a formação de grumos foi reduzida significativamente e aqueles que chegavam a se formar eram de tamanho pequeno. Provavelmente ocorreu, neste caso, uma complexação mais lenta dos polímeros, uma vez que a solução polimérica presente no reator estava mais diluída. Isto permitiu uma distribuição mais homogênea da pectina que estava sendo

adicionada à quitosana no reator e, conseqüentemente, interação mais uniforme entre as cadeias de ambos os polímeros.

Utilizando esta ordem de adição dos polímeros, foi testada a produção de *scaffolds* de Ch-P não reticulados e não neutralizados, assim como feito em pequena escala, utilizando-se para isso a quitosana de alta massa molar. A quitosana ChH foi escolhida, pois rendeu melhores resultados nos testes de complexação com alginato. O aspecto obtido é mostrado na Figura 3.8 – b. O filme formado era bastante frágil, quebradiço e de difícil manipulação, especialmente durante a etapa de lavagem.

Tendo em vista este resultado, testou-se a produção de *scaffolds* de Ch-P nas mesmas condições utilizadas para o preparo dos *scaffolds* de Ch-A, ou seja, na presença de reticulação primária e secundária com CaCl_2 e neutralização da mistura polimérica com NaOH 2M. Os filmes obtidos apresentaram-se íntegros e com aspecto satisfatório e, portanto, assim ficou estabelecida a metodologia de preparo dos filmes contendo pectina. O aspecto dos mesmos será mostrado no item a seguir.

3.1.3.2. *Caracterização preliminar dos scaffolds de geometria plana*

3.1.3.2.1. *Aspecto visual*

O aspecto visual dos *scaffolds* de quitosana (ChH, ChM ou ChL) complexada com alginato (A) ou pectina (P) na presença ou ausência do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B (S) e do tensoativo Kolliphor® P188 (K) é mostrado nas Figuras 3.9 a 3.12.

Na Figura 3.9, observa-se que os filmes constituídos do complexo Ch-A apresentam superfície lisa, sendo que a formulação obtida com ChL mostra-se mais opaca que as demais. Já para os filmes de Ch-P, todas as formulações têm aspecto semelhante, sendo geralmente mais opacas que as de Ch-A. A superfície destes filmes também é lisa, mas apresenta algumas bolhas decorrentes do processo de desaeração não eficiente (como indicado na Figura 3.9 – d). Para os filmes de Ch-P, o tempo de desaeração teve que ser reduzido em relação aos de Ch-A, uma vez que se observou princípio de separação de fases na mistura polimérica para tempos prolongados de processamento.

Na Figura 3.10, é possível observar que as formulações contendo Silpuran® 2130 A/B também possuem superfície lisa e aparentemente são mais opacas que aquelas isentas do composto. Nota-se a presença de gotículas do gel de silicone ao longo da matriz, o que é

observado claramente nas micrografias mostradas no item a seguir. Pequenas bolhas de ar estão presentes nas formulações de Ch-P-S, decorrentes provavelmente da desaeração não eficiente.

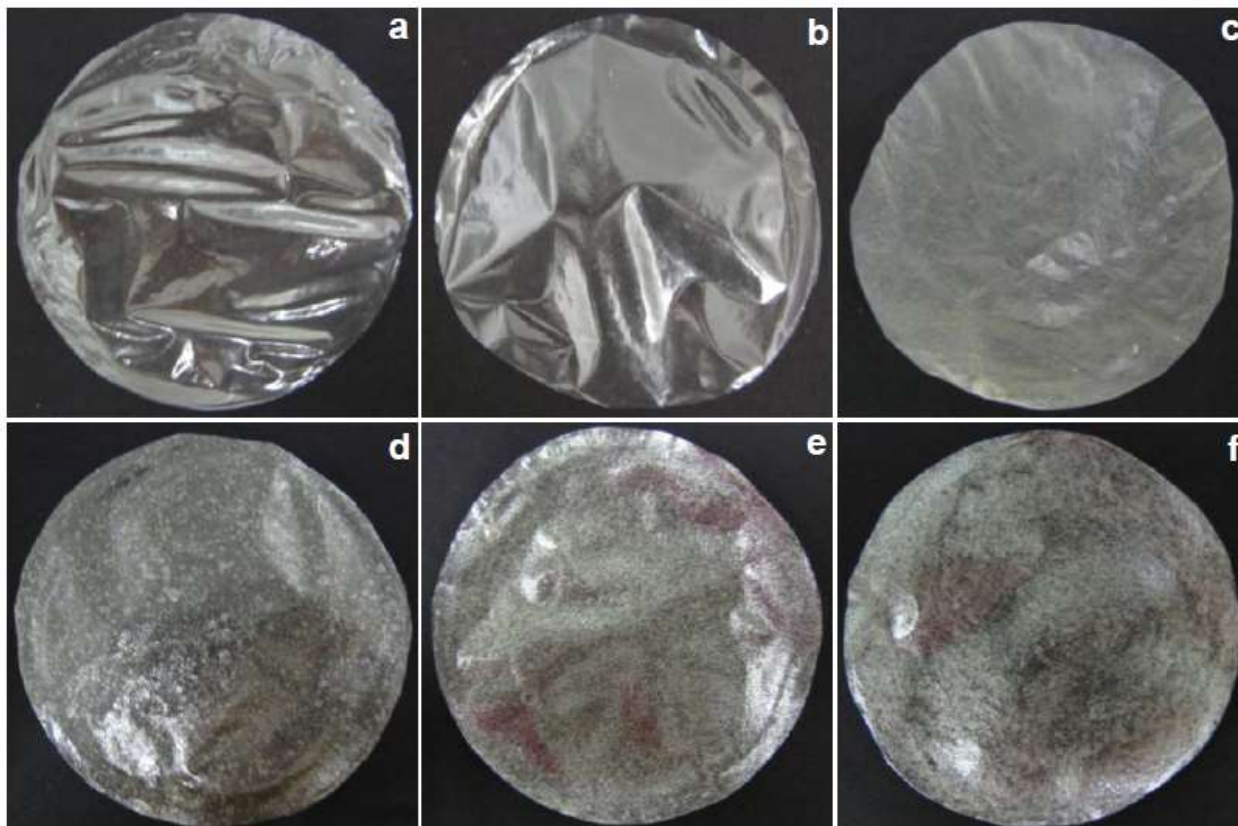


Figura 3.9: Aspecto visual dos *scaffolds* de quitosana de alta massa molar (a,d), média massa molar (b,e) e baixa massa molar (c,f) complexada com alginato (em cima) ou pectina (embaixo).

Para todas as formulações contendo Silpuran® 2130 A/B, observou-se o encolhimento do filme após a etapa de secagem. Filmes de Ch-A isentos do composto apresentam diâmetro final em torno de 13 cm, enquanto aqueles contendo o gel de silicone têm diâmetro final de cerca de 12 cm, com exceção das formulações contendo ChL ($\text{ØChL-A} = 11 \text{ cm}$; $\text{ØChL-A-S} = 10 \text{ cm}$). Já as formulações de Ch-P sem Silpuran® 2130 A/B têm diâmetro final aproximado de 14 cm, enquanto aquelas sem o composto têm diâmetro reduzido para 13 cm.

O Silpuran® 2130 A/B é um gel de silicone cuja reticulação ocorre por adição. Tanto o componente A quanto o B contêm grupos funcionais e agentes auxiliares para reticulação aditiva, sendo que o catalisador de platina está presente no componente A (Wacker Chemie,

2018). De acordo com Colas e Curtis (2013), pode haver encolhimento das cadeias do silicone decorrente da expansão térmica que ocorre durante a cura dos componentes quando esta é feita em temperatura acima da temperatura ambiente. Isto poderia explicar a retração das matrizes observada neste trabalho. Além disso, segundo os autores, a platina pode se ligar a grupamentos amino, formando complexos mais estáveis. Estas ligações atuam como outra forma de reticulação, envolvendo os grupos amino presentes na quitosana.

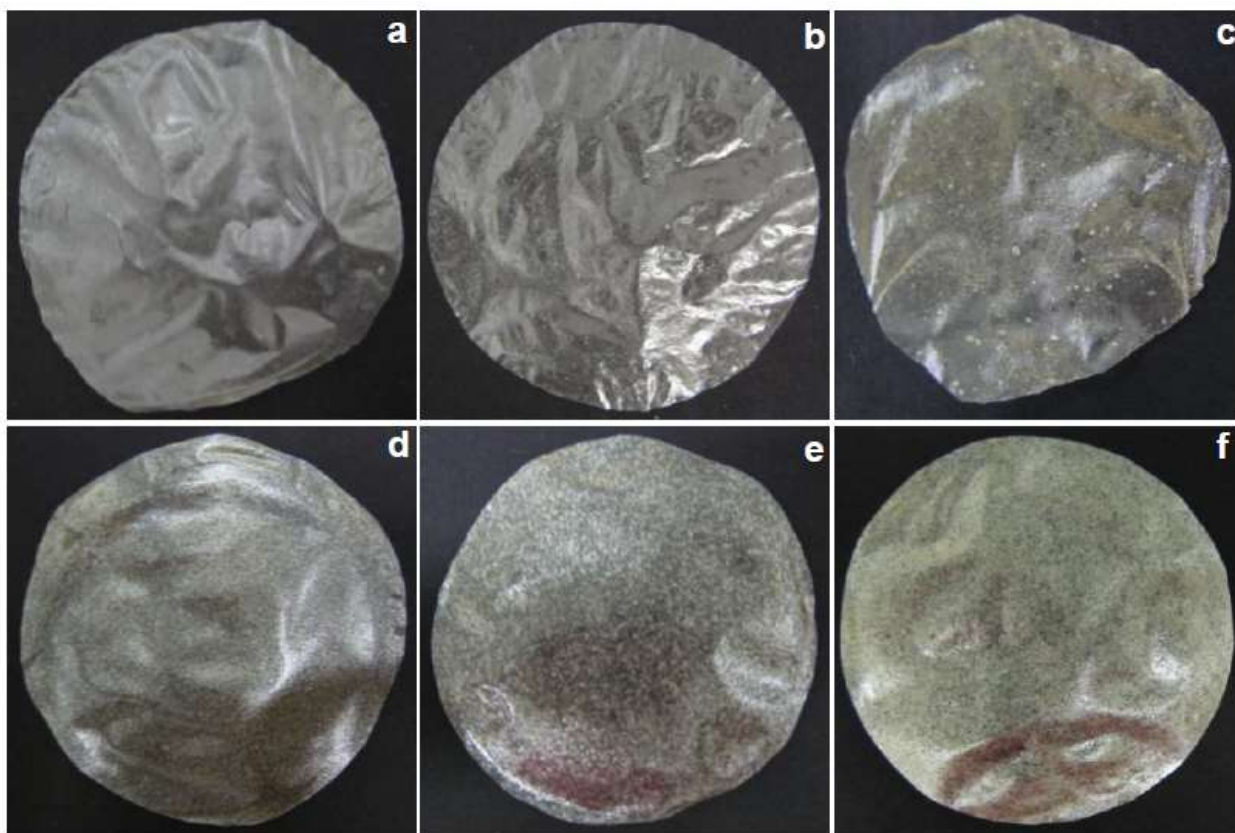


Figura 3.10: Aspecto visual dos *scaffolds* de quitosana de alta massa molar (a,d), média massa molar (b,e) e baixa massa molar (c,f) complexada com alginato (em cima) ou pectina (embaixo) contendo o gel de silicone Silpuran® 2130 A/B.

Na Figura 3.11, é possível observar que as formulações contendo Kolliphor® P188 têm aspecto esponjoso, apresentando porosidade uniforme ao longo de sua extensão. O aspecto dos filmes de Ch-A-K é similar àquele observado no trabalho de Bueno e Moraes (2011), que testaram o uso do Pluronic® F68 (análogo ao Kolliphor® P188) como uma estratégia para reforço das propriedades mecânicas de membranas de quitosana e alginato, visando melhora na dispersão

dos agregados poliméricos na mistura.

Nota-se que as formulações de Ch-P-K mostraram-se mais porosas que aquelas de Ch-A-K e que filmes constituídos de ChL-A-K são os menos porosos quando comparados aos demais. A morfologia destas matrizes será mais detalhadamente discutida no item a seguir.

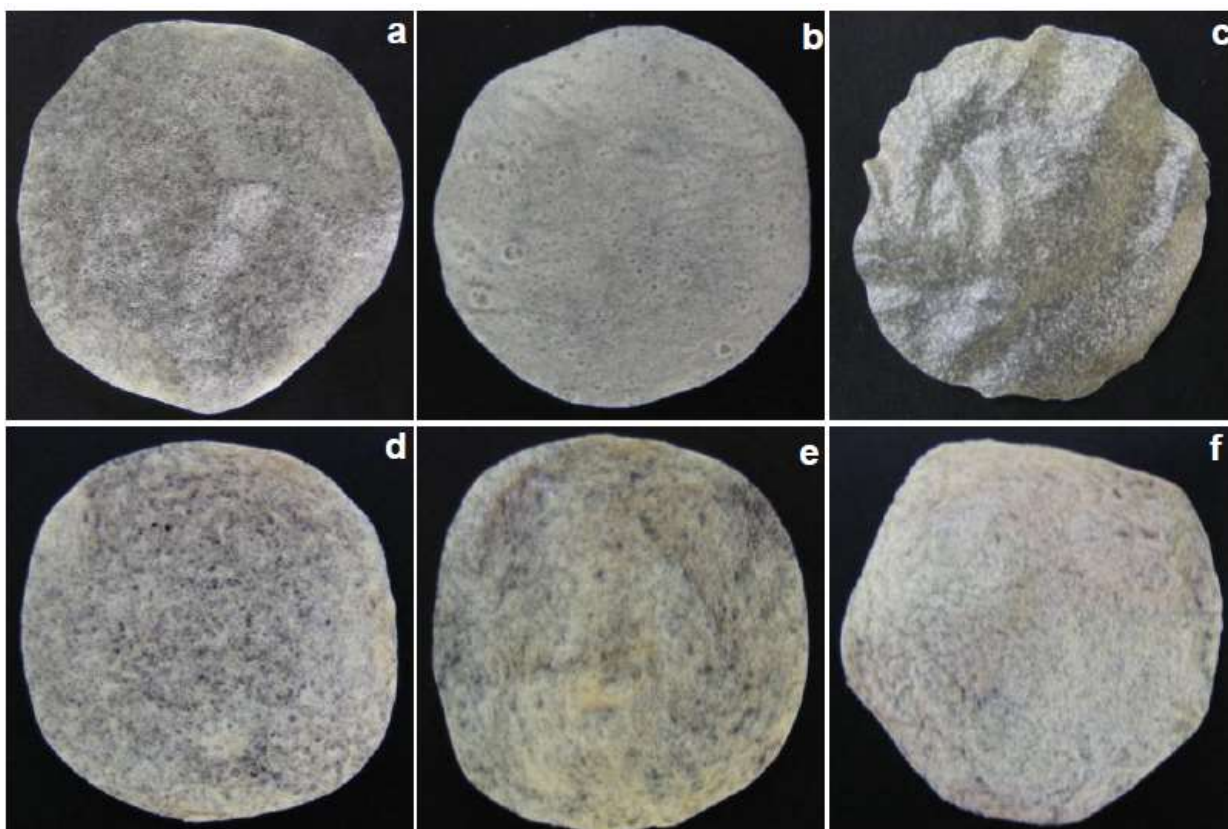


Figura 3.11: Aspecto visual dos *scaffolds* de quitosana de alta massa molar (a,d), média massa molar (b,e) e baixa massa molar (c,f) complexada com alginato (em cima) ou pectina (embaixo) contendo o tensoativo Kolliphor® P188.

Na Figura 3.12, observa-se que as formulações contendo Silpuran® 2130 A/B e Kolliphor® P188 têm também caráter esponjoso, sendo similares às aquelas isentas do gel de silicone. No entanto, neste caso, houve também o encolhimento dos filmes, resultando em diâmetros de cerca de 11 cm para Ch-A-S-K, com exceção das formulações contendo ChL (ØChL-A-S-K= 5 cm) e de 12 cm para Ch-P-S-K.

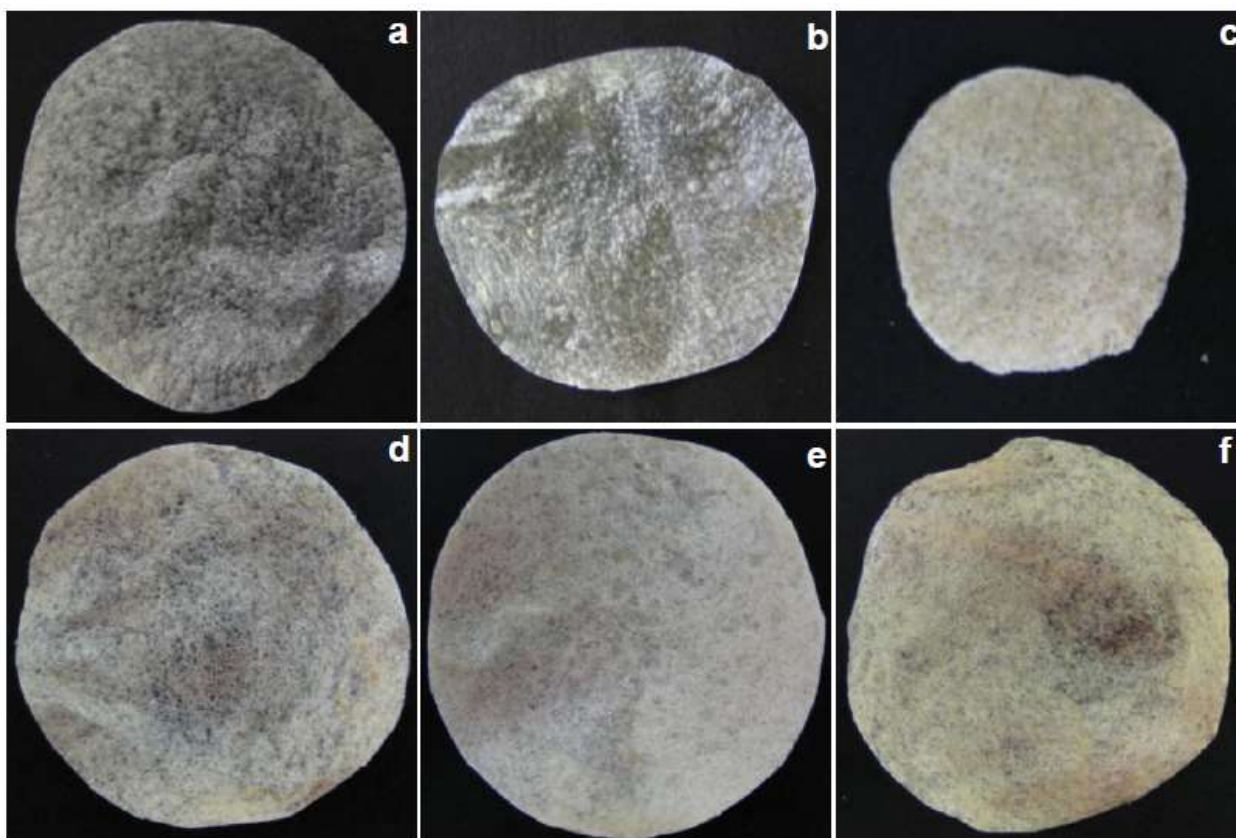


Figura 3.12: Aspecto visual dos *scaffolds* de quitosana de alta massa molar (a,d), média massa molar (b,e) e baixa massa molar (c,f) complexada com alginato (em cima) ou pectina (embaixo) contendo o gel de silicone Silpuran® 2130 A/B e o tensoativo Kolliphor® P188.

3.1.3.2.2. Espessura

Nas Tabelas 3.1 e 3.2 são mostrados os valores médios de espessura respectivamente para as membranas de quitosana combinada com alginato e pectina.

De acordo com a Tabela 3.1, para os *scaffolds* constituídos de quitosana e alginato, nota-se não houve diferença significativa entre as espessuras das formulações ChH-A e ChM-A, sendo estas similares àquela obtida por Pires e Moraes (2015), de aproximadamente 57 μm . A formulação ChL-A mostrou-se mais espessa, o que provavelmente está relacionado à retração observada do filme. Isto pode ter ocorrido, pois, por possuir menor cadeia, a quitosana de baixa massa molar tende a formar coacervados mais volumosos ao interagir com o alginato. Dessa forma, pode-se afirmar que se tem uma maior relação massa/área de filme em relação às demais formulações.

As formulações de quitosana e alginato contendo o gel de silicone, Ch-A-S, não

apresentam espessura significativamente diferente daquelas isentas do composto. Já as formulações contendo o tensoativo, Ch-A-K, se mostram mais espessas, como era esperado, devido ao ar introduzido e formação dos poros ao longo da matriz. Bueno *et al.* (2014) produziram *scaffolds* de quitosana e alginato utilizando Kolliphor® P188 como agente porogênico e obtiveram dispositivos com espessura de aproximadamente 500 µm, ou seja, maior que a das formulações correspondentes deste trabalho. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que a quitosana utilizada pelos autores era de massa molar mais elevada e, portanto, mais viscosa, possibilitando assim a retenção de maior quantidade de bolhas de ar na estrutura da matriz.

Tabela 3.1: Espessura dos *scaffolds* de quitosana (ChH, ChM ou ChL) complexada com alginato (A) na presença ou ausência do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B (S) e do tensoativo Kolliphor® P188 (K).

Formulação (Ch-A)	Espessura (µm)
ChH-A	55,8 ± 8,4 ^a
ChH-A-S	81,8 ± 27,8 ^a
ChH-A-K	229,7 ± 29,9 ^{a,c}
ChH-A-S-K	281,4 ± 74,4 ^{b,c,d}
ChM-A	51,5 ± 10,0 ^a
ChM-A-S	116,2 ± 23,9 ^{a,d}
ChM-A-K	414,2 ± 65,8 ^{b,c,g}
ChM-A-S-K	371,5 ± 134,8 ^{b,c,i}
ChL-A	125,2 ± 19,7 ^{a,d}
ChL-A-S	169,0 ± 12,0 ^{a,d}
ChL-A-K	226,8 ± 64,8 ^{a,c,d}
ChL-A-S-K	1403,8 ± 246,2 ^e

Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Para as formulações contendo quitosana e alginato na presença do gel de silicone e do agente tensoativo, Ch-A-S-K, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre as espessuras destes filmes e aqueles de Ch-A-K, para o caso de ChH e ChM. Para ChL, no entanto, a espessura obtida foi maior, o que pode ser explicado pela retração do filme, conforme mencionado anteriormente.

Os *scaffolds* de quitosana e pectina apresentaram espessuras similares aos de

quitosana e alginato, ou seja, os filmes contendo o gel de silicone têm espessura significativamente igual aos isentos do composto, enquanto os filmes contendo Kolliphor® P188 são mais espessos (Tabela 3.2). Em geral, as espessuras dos filmes Ch-P são maiores que as dos Ch-A, contendo ou não o gel de silicone e o tensoativo, o que pode ser atribuído às diferentes configurações das cadeias poliméricas.

Tabela 3.2: Espessura dos *scaffolds* de quitosana (ChH, ChM ou ChL) complexada com pectina (P) na presença ou ausência do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B (S) e do tensoativo Kolliphor® P188 (K).

Formulação (Ch-P)	Espessura (µm)
ChH-P	135,3 ± 23,2 ^{a,d}
ChH-P-S	125,1 ± 15,3 ^{a,d}
ChH-P-K	606,3 ± 228,5 ^{g,h}
ChH-P-S-K	505,4 ± 139,8 ^{b,g,i}
ChM-P	132,0 ± 19,6 ^{a,d}
ChM-P-S	131,3 ± 16,2 ^{a,d}
ChM-P-K	1000,6 ± 289,8 ^f
ChM-P-S-K	438,5 ± 211,8 ^{b,g}
ChL-P	161,1 ± 20,5 ^{a,d}
ChL -P-S	163,5 ± 21,5 ^{a,d}
ChL -P-K	508,8 ± 153,5 ^{b,g}
ChL -P-S-K	760,4 ± 128,1 ^h

Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Veiga (2012) obteve filmes de quitosana e pectina de espessura de aproximadamente 205 µm, valor maior que o obtido no presente trabalho para as formulações correspondentes. No entanto, no presente trabalho, ao contrário do trabalho da autora, duas etapas de reticulação foram realizadas, o que promoveu maior aproximação das cadeias poliméricas, resultando em maior compactação e consequente menor espessura da matriz.

Desvios padrões relativamente elevados foram obtidos para a espessura dos *scaffolds*. Isto pode ser atribuído à heterogeneidade das amostras, decorrente da distribuição não uniforme da mistura polimérica sobre a superfície das placas de Petri utilizadas para moldar os filmes. Além disso, as amostras porosas são muito compressíveis, o que dificulta a medida da espessura por meio do micrômetro.

3.1.3.2.3. Morfologia da superfície e da seção transversal

As morfologias da superfície e da seção transversal dos *scaffolds* de quitosana (ChH, ChM ou ChL) complexada com alginato (A) ou pectina (P) na presença ou ausência do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B (S) e do tensoativo Kolliphor® P188 (K) são mostradas nas Figuras 3.13 a 3.20.

Para todas as formulações isentas de Silpuran® 2130 A/B e Kolliphor® P188, as amostras apresentaram superfície lisa e seção transversal com estrutura densa e compacta, conforme mostrado nas Figuras 3.13 e 3.14.

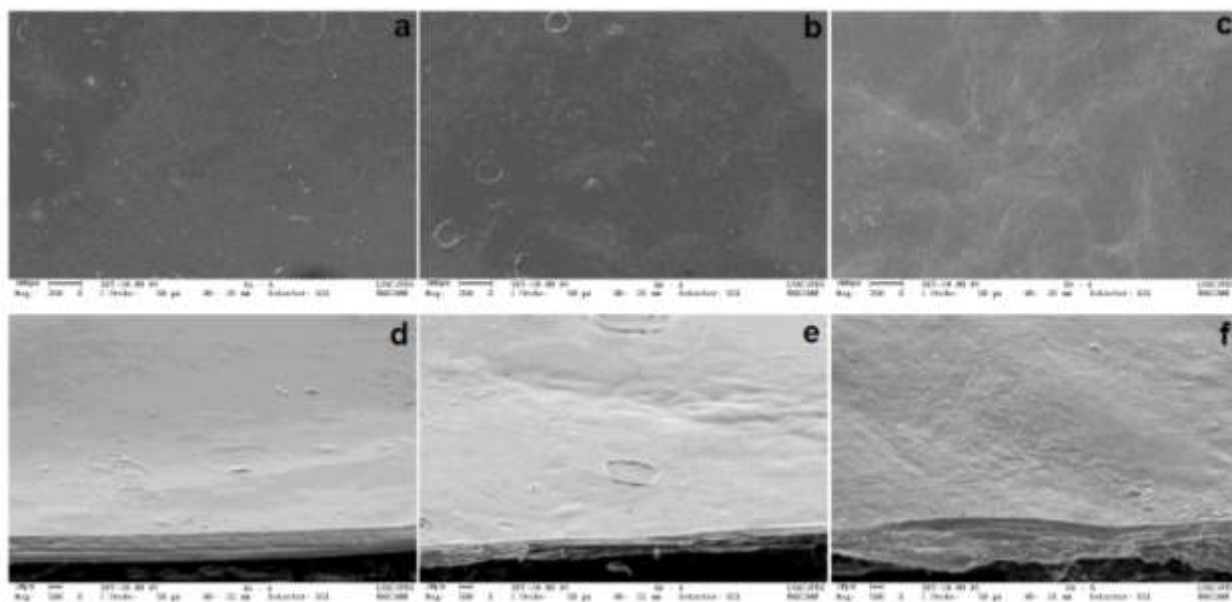


Figura 3.13: Superfície e seção transversal das membranas de alginato complexado com quitosana de massa molar alta (a,d), média (b,e) e baixa (c,f).

Nas formulações contendo Silpuran® 2130 A/B, observa-se saliências na forma de bolhas que provavelmente são gotículas do gel de silicone dispersas irregularmente por toda a superfície e também na seção transversal, como mostrado nas Figuras 3.15 e 3.16. Estas gotículas se formam porque o silicone é um composto hidrofóbico que possui, portanto, baixa solubilidade nas misturas poliméricas Ch-A e Ch-P, de caráter hidrofílico, e assim tende a ficar disperso na matriz desta forma.

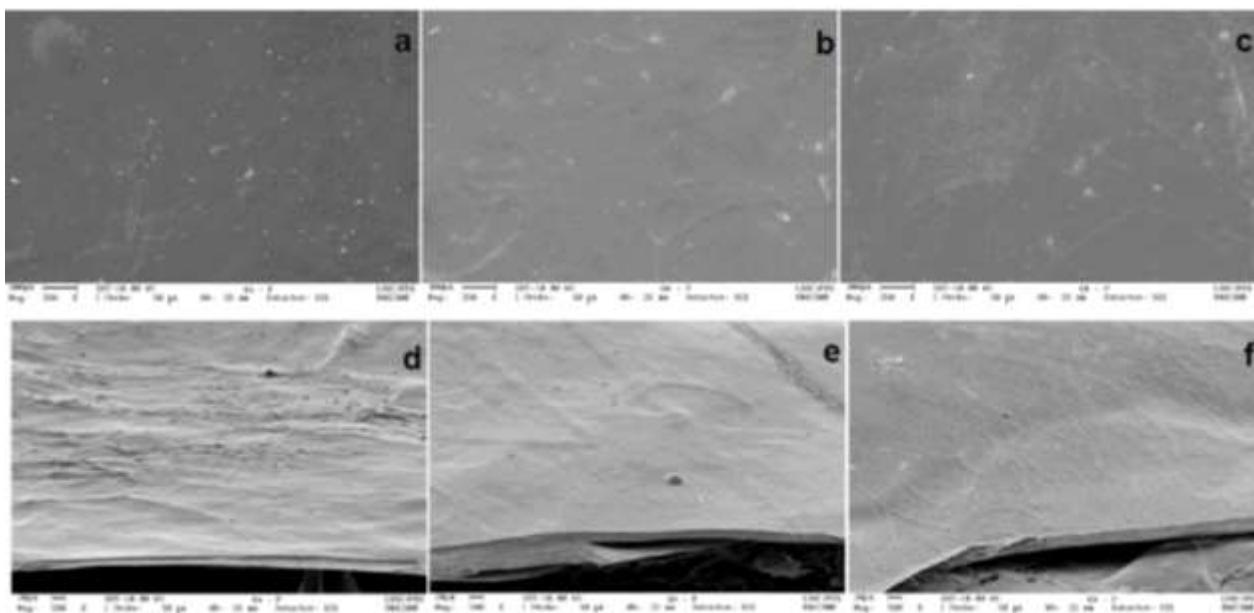


Figura 3.14: Superfície e seção transversal das membranas de pectina complexada com quitosana de massa molar alta (a,d), média (b,e) e baixa (c,f).

Pires e Moraes (2015) observaram estrutura bastante semelhante em membranas de quitosana e alginato de baixa viscosidade contendo 10% (m/m) de Silpuran[®] 2130 A/B produzidas visando à aplicação no tratamento de lesões de pele. Segundo as autoras, devido à elevada viscosidade do complexo, bolhas de ar ficam retidas na estrutura da matriz e contribuem para a dispersão do silicone na forma de gotículas. De fato, para as formulações com quitosana de alta massa molar (ChH-A-S e ChHA-P-S), cuja viscosidade é maior, observa-se um maior número de gotículas na superfície em relação às formulações com ChM e ChL.

Algumas das saliências na superfície e cavidades com aspecto de bolhas na seção transversal das amostras contendo Silpuran[®] 2130 A/B podem ser também bolhas de ar formadas em decorrência de reações que geram gases a partir dos constituintes do gel de silicone, conforme relatado por Fawcett *et al.* (2010). Segundo os autores, em filmes contendo elastômeros de silicone com catalisadores à base de platina, como o Silpuran[®] 2130 A/B, tais reações podem ocorrer, originando assim as bolhas de ar. Além disso, bolhas de ar podem ter permanecido retidas na estrutura das matrizes poliméricas devido a uma desaeração não eficiente.

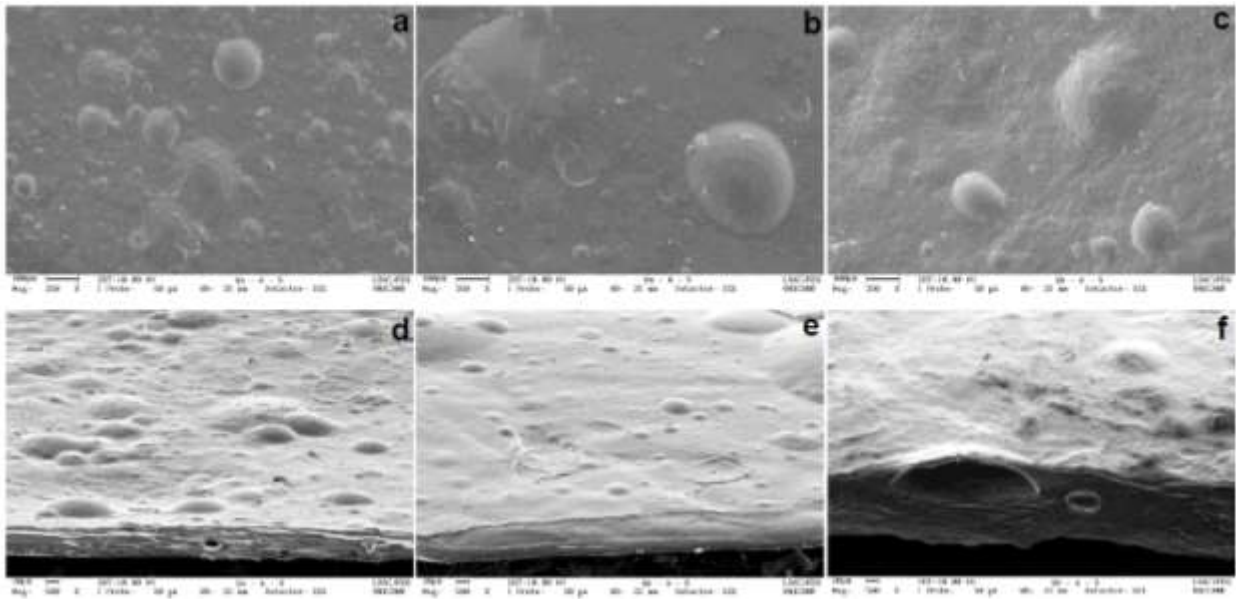


Figura 3.15: Superfície e seção transversal das membranas de alginato e quitosana de massa molar alta (a,d), média (b,e) e baixa (c,f) contendo Silpuran® 2130 A/B.

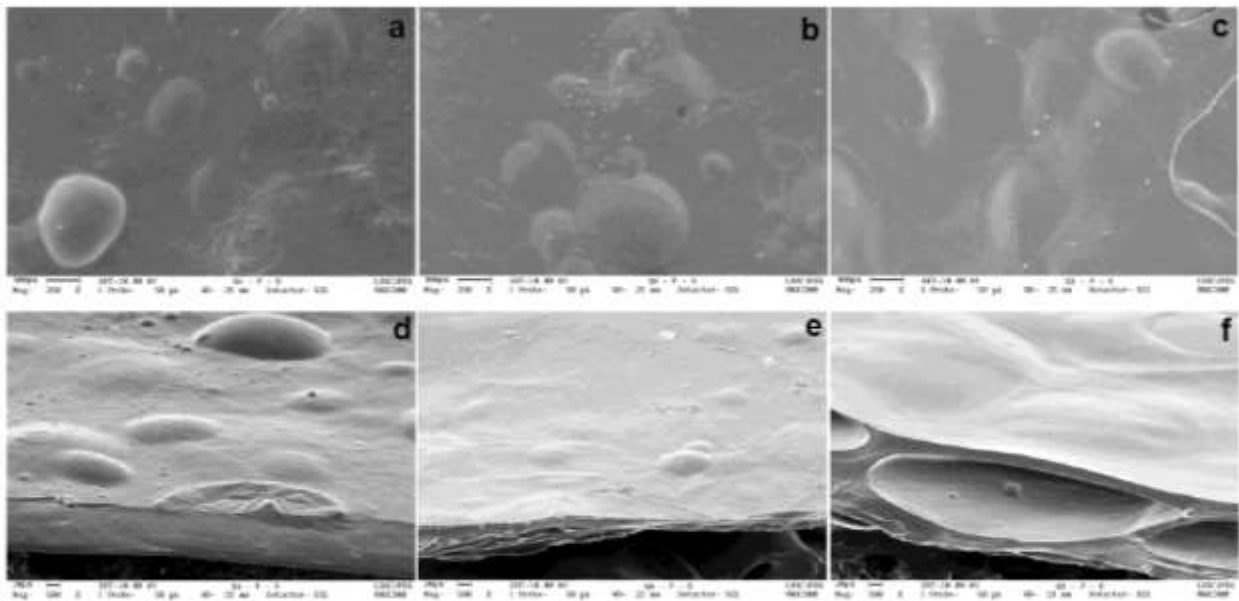


Figura 3.16: Superfície e seção transversal das membranas de pectina e quitosana de massa molar alta (a,d), média (b,e) e baixa (c,f) contendo Silpuran® 2130 A/B.

As micrografias das amostras contendo Kolliphor® P188 são mostradas nas Figuras 3.17 e 3.18. Observa-se que para as formulações preparadas com as quitosanas ChH e ChM,

especialmente as complexadas com alginato, houve maior formação de poros comparativamente às formulações preparadas com a quitosana ChL. Isso ocorreu provavelmente devido à maior viscosidade das quitosanas ChH e ChM em relação à quitosana ChL, que permitiu que uma maior quantidade de bolhas de ar ficasse retida na solução polimérica, originando os poros. Já para as formulações contendo pectina, não se observou diferença significativa na quantidade de poros para diferentes tipos de quitosana. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que como a própria solução aquosa de pectina, de concentração 2% (m/v) apresentava viscosidade maior que a solução aquosa de alginato, de concentração 0,5% (m/v), os complexos poliméricos de Ch-P eram intrinsecamente mais viscosos que aqueles de Ch-A, não havendo diferença perceptível na viscosidade das soluções de Ch-P. Observando-se as micrografias das formulações com aspecto mais esponjoso, verifica-se que os poros formados tem tamanhos entre cerca de 100 e 600 μm , podendo assim ser considerados adequados para células animais.

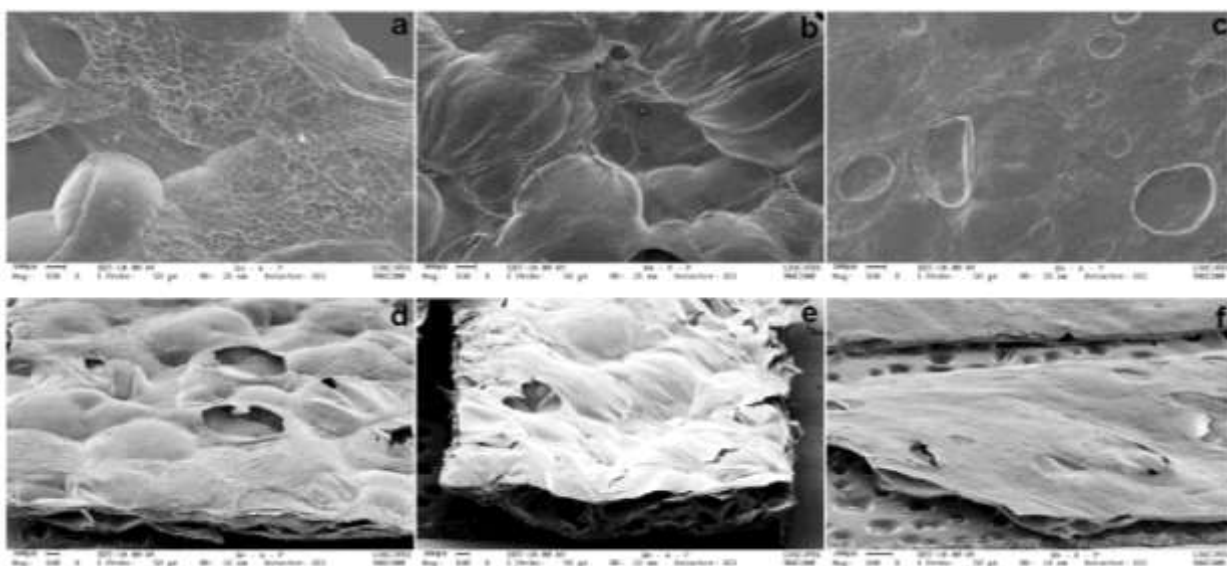


Figura 3.17: Superfície e seção transversal das membranas de alginato e quitosana de massa molar alta (a,d), média (b,e) e baixa (c,f) contendo Kolliphor® P188.

As micrografias apresentadas por Bueno e Moraes (2011), que obtiveram matrizes porosas de quitosana e alginato de baixa viscosidade com o uso dos tensoativos Pluronic® F68 (análogo ao Kolliphor® P188) e Tween® 80, são bastante semelhantes às obtidas no presente trabalho. As autoras relataram a formação de poros medindo de 90 a 300 μm , que consideraram adequados para *scaffolds* empregados na terapia de lesões de pele.

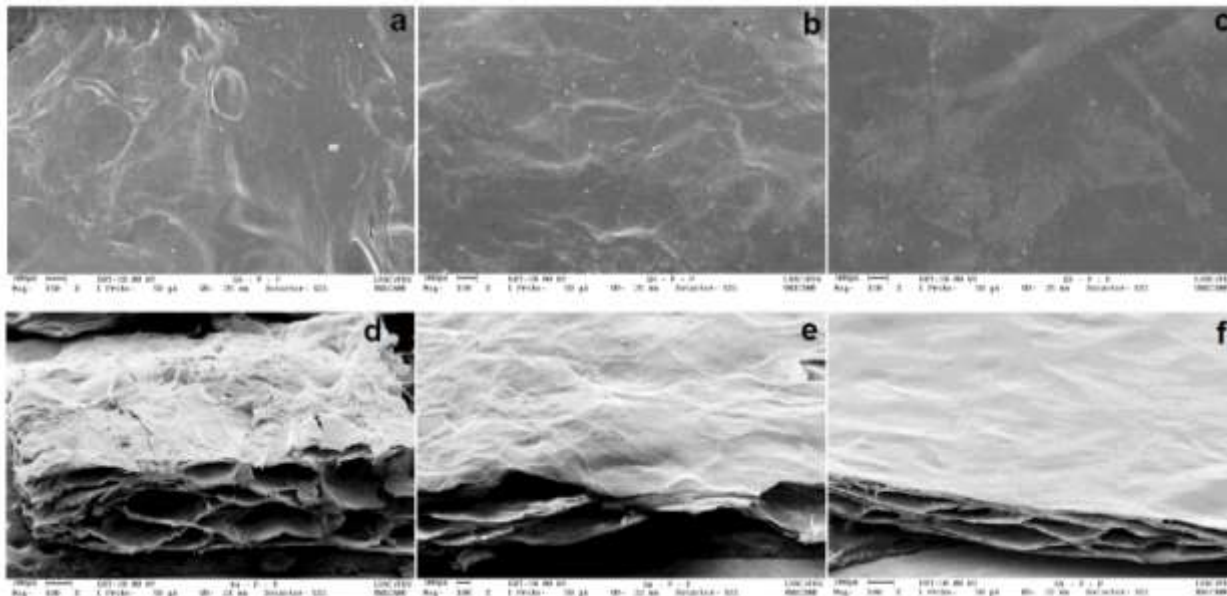


Figura 3.18: Superfície e seção transversal das membranas de pectina e quitosana de massa molar alta (a,d), média (b,e) e baixa (c,f) contendo Kolliphor® P188.

Coimbra *et al.* (2011) produziram matrizes porosas de quitosana e pectina pelo método de freeze-drying visando à aplicação como *scaffolds* na engenharia de tecidos ósseos. Os *scaffolds* formados apresentaram poros de até 500 μm e foram bem sucedidos como suportes para a adesão e proliferação de osteoblastos.

Nas Figuras 3.19 e 3.20 são mostradas as micrografias das formulações contendo tanto o gel de silicone Silpuran® 2130 A/B como o tensoativo Kolliphor® P188.

Observam-se novamente as gotículas do gel de silicone dispersas pela superfície da matriz em todas as formulações e também no interior dos poros em algumas delas, como pode ser facilmente visualizado na formulação ChM-P-S-K (Figura 3.20 – b,e). No caso dos *scaffolds* produzidos pela complexação da quitosana com alginato, a presença do silicone juntamente com o tensoativo resultou em matrizes menos porosas quando comparadas àquelas contendo apenas o tensoativo. A formulação produzida pela complexação da quitosana de baixa massa molar com o alginato permaneceu sendo a menos porosa dentre todas. Para as formulações de quitosana com pectina, os *scaffolds* continuaram com aspecto bastante esponjoso, especialmente quando usadas as quitosanas ChH e ChM, não tendo sido afetados pela presença de ambos aditivos.

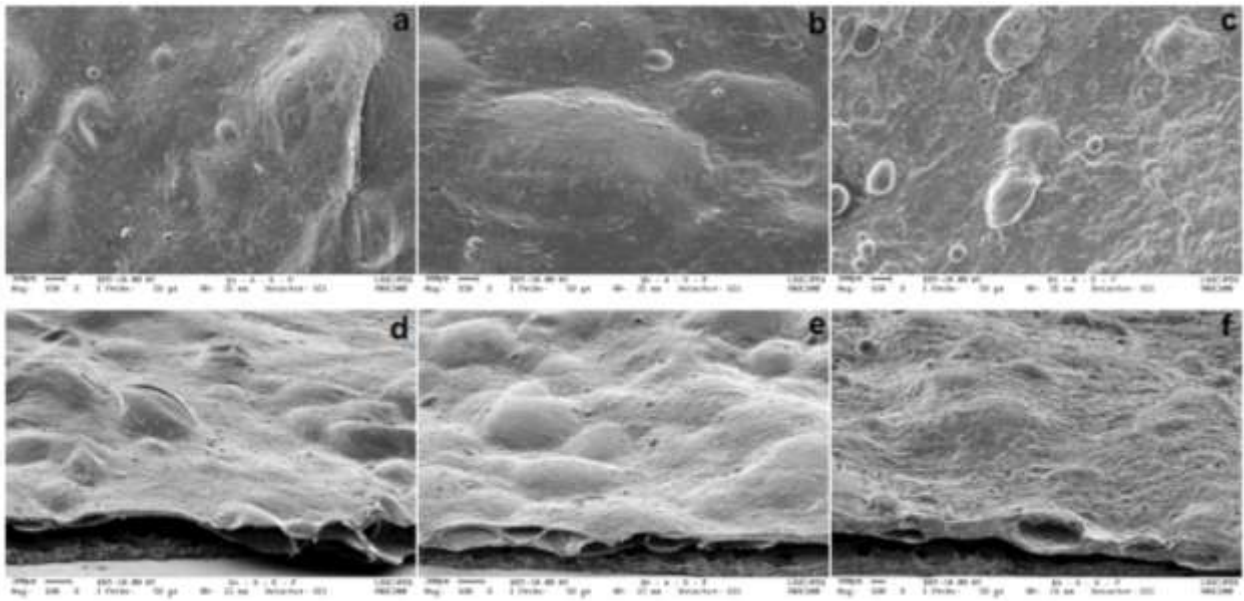


Figura 3.19: Superfície e seção transversal das membranas de quitosana de alta massa molar (a,d), média massa molar (b,e) e baixa massa molar (c,f) complexada com alginato contendo o gel de silicone Silpuran® 2130 A/B e o tensoativo Kolliphor® P188.

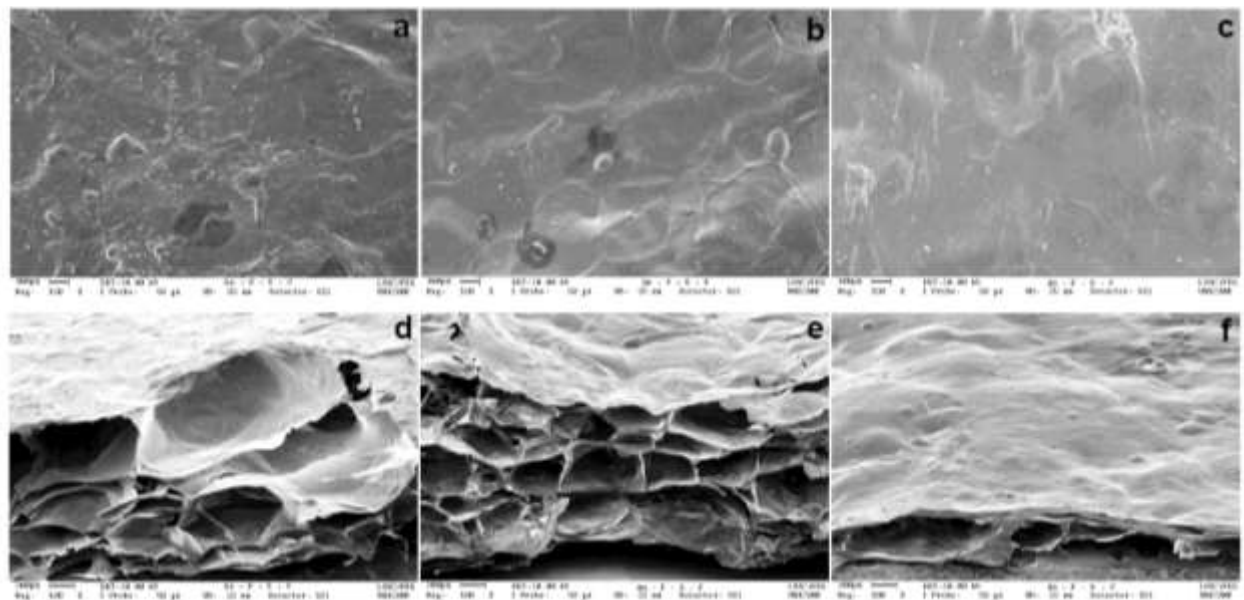


Figura 3.20: Superfície e seção transversal das membranas de quitosana de alta massa molar (a,d), média massa molar (b,e) e baixa massa molar (c,f) complexada com pectina contendo o gel de silicone Silpuran® 2130 A/B e o tensoativo Kolliphor® P188.

3.1.3.2.4. Capacidade de absorção de meio de cultura alfa-MEM

Avaliar a capacidade dos *scaffolds* de absorver meio de cultura é importante, pois esta propriedade indica se ocorre o intumescimento necessário da matriz para possibilitar a penetração do meio e o transporte de nutrientes essenciais ao crescimento celular.

As Tabelas 3.3 e 3.4 mostram que os *scaffolds* contendo alginato absorvem, em geral, quantidade pouco maior de meio de cultura quando comparados àqueles contendo pectina. Como exceção tem-se as formulações produzidas pela complexação de ChL e A, as quais apresentaram as menores capacidades de absorção. Conforme visto anteriormente, tal formulação possui estrutura mais densa ou compacta, o que possivelmente dificulta a entrada de fluido na matriz.

Tabela 3.3: Capacidade de absorção de meio de cultura alfa-MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino dos *scaffolds* de quitosana (ChA, ChM ou ChL) e alginato (A) na presença ou ausência de Silpuran® 2130 A/B (S) e de Kolliphor® P188 (K).

Formulação (Ch-A)	Absorção (g/g)
ChH-A	15,06 ± 0,23 ^a
ChH-A-S	12,23 ± 0,88 ^{a,b}
ChH-A-K	13,32 ± 1,68 ^{a,c}
ChH-A-S-K	11,53 ± 1,67 ^{a,b,d}
ChM-A	12,77 ± 2,71 ^{a,e}
ChM-A-S	11,63 ± 0,79 ^{a,b,d}
ChM-A-K	14,14 ± 2,27 ^a
ChM-A-S-K	12,23 ± 2,44 ^{a,b}
ChL-A	5,52 ± 0,53 ^{f,g}
ChL-A-S	3,50 ± 0,62 ^g
ChL-A-K	7,89 ± 0,52 ^{d,f,h}
ChL-A-S-K	6,64 ± 0,97 ^{f,g,i}

Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Bueno *et al.* (2014) obtiveram valores de capacidade de absorção de água e soro fetal bovino (SFB) para matrizes porosas de quitosana e alginato contendo 10% de Pluronic F68® de cerca de 21 g/g e 13 g/g, respectivamente. Os autores justificam a menor capacidade de absorção de SFB pela presença de íons neste meio que podem blindar cargas remanescentes nos polissacarídeos, reduzindo a repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas e originando uma estrutura mais compacta, com menor capacidade de absorção de fluidos. Comparando-se aos resultados obtidos neste trabalho para as formulações contendo alginato produzidas com o uso de quitosana de alta e média massa molar, verifica-se capacidade de absorção de meio de cultura semelhante àquela de SFB. Logo, pode-se inferir que ocorre comportamento similar no sistema estudado no presente trabalho.

Pode-se afirmar que a capacidade de absorção de meio de cultura pelos *scaffolds* produzidos é considerada satisfatória, com exceção das formulações contendo ChL e A.

Tabela 3.4: Capacidade de absorção de meio de cultura alfa-MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino dos *scaffolds* de quitosana (ChA, ChM ou ChL) e pectina (P) na presença ou ausência de Silpuran® 2130 A/B (S) e de Kolliphor® P188 (K).

Formulação (Ch-P)	Absorção (g/g)
ChH-P	7,19 ± 0,54 ^{f,g,i}
ChH-P-S	6,76 ± 0,36 ^{f,g,i}
ChH-P-K	10,03 ± 0,56 ^{b,c,e,h,i,j}
ChH-P-S-K	9,38 ± 0,51 ^{b,e,h,i,j}
ChM-P	9,85 ± 1,71 ^{b,c,e,h,i,j}
ChM-P-S	6,59 ± 0,41 ^{f,g,j}
ChM-P-K	9,08 ± 0,64 ^{b,e,f}
ChM-P-S-K	7,34 ± 0,52 ^{f,j}
ChL-P	8,42 ± 0,76 ^{b,f}
ChL-P-S	7,48 ± 0,86 ^{f,j}
ChL-P-K	7,36 ± 1,41 ^{f,j}
ChL-P-S-K	7,28 ± 0,36 ^{f,g,j}

Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

3.1.3.3. *Estabelecimento da metodologia de preparação dos scaffolds de geometria tubular*

3.1.3.3.1. *Escolha da membrana a ser utilizada para a moldagem dos scaffolds tubulares*

A opção mais conveniente no que diz respeito ao tipo de membrana semipermeável utilizada na moldagem dos *scaffolds* tubulares seriam membranas de diálise, já que membranas de diversos tipos e tamanhos estão disponíveis comercialmente. No entanto, tendo em vista que o custo de membranas de diálise é geralmente elevado, decidiu-se por empenhar esforços na tentativa de utilizar recursos disponíveis no laboratório para produzir uma membrana de policaprolactona eletrofiada que fosse capaz de atuar como a membrana de diálise. Para tal, a membrana de PCL deveria ser capaz de permitir a passagem de íons cálcio para seu interior, promovendo assim a reticulação da solução polimérica lá existente, além de bloquear a passagem de solução polimérica para seu exterior.

De acordo com os resultados mostrados no Apêndice D, as membranas de PCL produzidas não se mostraram adequadas à aplicação desejada, portanto, optou-se por dar sequência ao trabalho utilizando-se membranas de diálise disponíveis comercialmente. Fez-se uma busca no mercado por membranas de diálise de diâmetro de cerca de 10 mm, que seria o mais adequado para se fazer a moldagem dos *scaffolds*. A membrana com dimensões mais próximas encontrada foi de 11,5 mm de diâmetro e massa molar de corte de 3500 Da. Esta foi utilizada nos ensaios subsequentes.

3.1.3.3.2. *Avaliação da concentração da solução de cloreto de cálcio mais adequada para reticulação secundária*

A concentração da solução de cloreto de cálcio utilizada para na produção dos *scaffolds* tubulares foi avaliada, pois a disponibilidade de íons cálcio é um fator crucial para a estabilidade dos complexos polieletrólitos estudados neste trabalho. De acordo com Pavlath e Robertson (1999), no processo de reticulação por imersão existe uma relação competitiva entre a dissolução da matriz e sua reticulação, de forma que a concentração da solução iônica deve ser alta o suficiente para que ocorra a predominância do processo de difusão dos íons ou reticulação. A dissolução da matriz é intensa na ausência de íons cálcio, levando a alterações irreversíveis. Por outro lado, concentrações muito elevadas de Ca^{2+} provocam uma reticulação muito rápida e intensa na superfície, formando um bloqueio à difusão dos íons para o interior da matriz. Isto leva

a formação de estruturas com reticulação incompleta e propriedades mecânicas comprometidas.

No presente trabalho, o complexo polimérico utilizado já possui um grau de reticulação primária devido à adição de íons cálcio durante o processamento da mistura. Sendo assim, a relação competitiva entre a desestruturação da matriz tridimensional formada e a difusão do cálcio seria reduzida, predominando a reticulação pelos íons.

Estudou-se nesta seção a influência da variação da concentração da solução de CaCl_2 utilizada na reticulação secundária com o intuito de verificar qual seria a melhor condição para a obtenção de uma matriz estável. A reticulação é também uma função do tempo de exposição à solução de CaCl_2 além de sua concentração (Pavlati e Robertson, 1999). Sendo assim, incubou-se as amostras por um período relativamente longo em geladeira para que o cálcio tivesse tempo de se difundir para a matriz como um todo. A solução de CaCl_2 foi trocada na metade do tempo a fim de se garantir a disponibilização de íons cálcio durante todo o período reservado à reticulação.

Soluções de cloreto de cálcio de concentrações 2, 7, 12 e 20% (m/v) foram testadas para a realização da reticulação secundária dos *scaffolds* tubulares. Analisando-se o aspecto e integridade dos *scaffolds* tubulares obtidos, foi possível observar que formulações preparadas por reticulação com CaCl_2 a 2%, apresentaram estruturas não uniformes e frágeis, muito difíceis de manusear, sendo que em alguns casos o tubo nem mesmo chegou a ser formado. Pode-se dizer que não havia íons cálcio suficientes para promover uma reticulação secundária efetiva. Já as formulações preparadas com CaCl_2 na concentração de 7% apresentaram-se íntegras, porém também bastante frágeis ao manuseio. A formulação obtida com CaCl_2 12% apresentou-se íntegra e mais resistente ao manuseio. Não houve a formação de uma estrutura tubular íntegra quando se utilizou a solução de CaCl_2 a 20%. Isso ocorreu provavelmente porque havia excesso de íons cálcio na solução, que promoveu uma reticulação intensa na superfície do tubo e dificultou a difusão dos íons para o interior da estrutura. Elegeram-se assim as formulações preparadas com a solução de CaCl_2 a 12% para a realização dos testes posteriores.

3.1.4. Conclusão

Foi possível desenvolver metodologias de preparo dos *scaffolds* de geometria plana constituídos de quitosana complexada com alginato ou pectina contendo ou não o gel de silicone Silpuran[®] 2130 A/B e o tensoativo Kolliphor[®] P188. Os *scaffolds* obtidos de acordo com a metodologia estabelecida para cada formulação foram caracterizados quanto ao seu aspecto

visual, morfologia, espessura e absorção de meio de cultura suplementado. Os resultados mostraram que os *scaffolds* obtidos com quitosana de alta e média massa molar são mais promissores que aqueles produzidos com quitosana de baixa massa molar uma vez que possuem, em geral, melhor aspecto visual, porosidade adequada, e maior capacidade de absorção de meio de cultura. Além disso, não sofrem retração após a etapa de secagem, mantendo as dimensões próximas às da moldagem. Estes resultados foram mais pronunciados nas formulações contendo alginato, no entanto, a fim de manter o paralelismo entre as formulações, optou-se por eliminar as formulações contendo quitosana de baixa massa molar complexada tanto com alginato quanto com pectina para os ensaios futuros.

Além disso, foram estudadas as condições a serem utilizadas na produção de *scaffolds* tubulares de acordo com uma nova metodologia desenvolvida. Foram avaliados o tipo de membrana utilizada para a moldagem do tubo e a concentração da solução de cloreto de cálcio mais adequada para reticulação secundária. A produção de membranas de PCL adequadas para utilização como membranas de diálise na moldagem dos tubos não foi bem sucedida. Para este fim, foram utilizadas membranas disponíveis comercialmente, de dimensões apropriadas de acordo com o diâmetro interno e espessura desejados para os *scaffolds*. A reticulação secundária dos *scaffolds* tubulares foi favorecida quando se utilizou uma concentração da solução de cloreto de cálcio de 12% e esta condição foi escolhida para preparação de tubos para ensaios posteriores.

3.2. COMPARATIVE STUDY ON COMPLEXES FORMED BY CHITOSAN AND DIFFERENT POLYANIONS: POTENTIAL OF CHITOSAN-PECTIN BIOMATERIALS AS SCAFFOLDS IN TISSUE ENGINEERING[§]

Fernanda Carla Bombaldi de Souza¹, Renata Francielle Bombaldi de Souza¹, Bernard Drouin²,
Diego Mantovani² and Ângela Maria Moraes^{1*}

¹ Department of Engineering of Materials and of Bioprocesses, School of Chemical Engineering,
University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Canada Research Chair I in Biomaterials and
Bioengineering for the Innovation in Surgery, Department of Min-Met-Materials Engineering,
Research Center of CHU de Quebec, Division of Regenerative Medicine, Laval University,
Quebec, QC, Canada

*Correspondence to: Â. M. Moraes (E-mail: ammoraes@feq.unicamp.br)

3.2.1. Abstract

In this work, polyelectrolyte complexes of chitosan and pectin were produced in the presence or absence of the silicone gel Silpuran® 2130 A/B (S) and the surfactant Kolliphor® P188 (K) using chitosan of high (ChH) and medium (ChM) molar weight. The effects of varying the formulation of the scaffolds on their properties were analyzed and compared to those observed when combining chitosan to alginate instead of pectin. As expected, highly porous scaffolds were obtained in the presence of the surfactant for both pectin and alginate-containing scaffolds. Ch-P-based formulations presented higher porosity (up to 83.3 %) and thickness (maximum of 2273.5 µm in PBS). The analysis of the surface properties showed microscale roughness for all scaffolds (1.0 to 12.5 µm) and lower water contact angle for alginate-containing formulations (minimum of 36.8 degrees). Moreover, these formulations presented higher swelling and mass loss in PBS (reaching up to 21.7 g/g and 80.4 %, respectively). The addition of S to the

§ Este artigo foi publicado com modificações na revista internacional indexada *International Journal of Biological Macromolecules* e está sendo reproduzido com permissão da editora Elsevier / This paper was published with modifications in the *International Journal of Biological Macromolecules* and is herein reprinted with permission from Elsevier. Ref.: Souza, F.C.B.; Souza, R.F.B.; Drouin, B.; Mantovani, D.; Moraes, A.M. Comparative study on complexes formed by chitosan and different polyanions: Potential of chitosan-pectin biomaterials as scaffolds in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 132 (2019)178-189.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.187>

polymeric matrices improved their elastic moduli, reaching a maximum of 4 times fold change at 40% strain. Besides, the use of pectin augmented the elastic moduli in comparison to the use of alginate, reaching 66 times and 4 times fold changes for dense and porous formulations, respectively, for the same strain level. Pectin-containing scaffolds presented poroviscoelasticity, a typical mechanical feature of many soft tissues. The suitability of the materials for tissue engineering applications was demonstrated in terms of stability upon degradation in culture medium or lysozyme solution, as well as lack of cytotoxicity. In summary, this study evidences the potential of Ch-P-based materials to be further explored for this purpose, especially to improve the mechanical properties of chitosan-based scaffolds, contributing to broaden the range of applications of this class of materials in the medical field.

Keywords: chitosan, alginate, pectin, mechanical properties, poroviscoelasticity, tissue engineering scaffolds

3.2.2. Introduction

Naturally occurring polymers, such as polysaccharydes, proteins and polynucleotides, can be considered as the main class of natural raw materials for the production of biomaterials used clinically. The structural and functional molecules of these materials confer them properties such as biodegradability, biocompatibility and biological activity, which allow them to promote excellent cell adhesion and growth and enhance their performance in biological systems (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Chitosan has drawn a lot of attention in the field of scaffolds for tissue engineering applications not only because it can be obtained from abundant renewable sources, but also due to its appealing intrinsic properties. This polymer consists of units of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine and behaves as a polycation at pH below 6.3.

Polyelectrolyte complexes (PEC) can be formed between chitosan and negatively charged polymers, such as alginate or pectin, mainly due to interactions of electrostatic nature. Calcium ions are normally added for reinforcing the PEC structure. The most important factors that affect PEC formation are pH, temperature, ionic strength and sequence of mixing of the polymer solutions. Moreover, flexibility of polymers, molar weight and degree of deacetylation of chitosan and the substitution degree of the other polyelectrolyte also affect the final properties

of the PEC and have to be considered. Particularly, the molar weight and deacetylation degree of chitosan (which corresponds to the ratio between glucosamine and N-acetyl glucosamine groups) determine the density of charges in the polymer and directly affect its chemical and biological properties.

The combination of chitosan with other materials allows obtaining scaffolds with improved microstructure, mechanical resistance, swelling ability and biocompatibility. Alginates are anionic polysaccharides widely used in combination with chitosan in the biomedical field, being extensively explored for tissue engineering applications, such as for bone (Algul *et al.*, 2015; Sowjanya *et al.*, 2013), cartilage (Reed and Wu, 2017; Zhao *et al.*, 2014), skin (Bierhalz and Moraes, 2016; Bueno *et al.*, 2014), ligament and tendon (Majima *et al.*, 2005), neural (Wang *et al.*, 2017) or vascular (Neufurth *et al.*, 2015; Wilkens *et al.*, 2016) tissue engineering.

Alginate hydrogels are formed by intermolecular crosslinking of guluronic acid blocks present in the polymer structure with bivalent cations, e.g. Ca^{2+} , resulting in the characteristic egg-box-like stacked structure. Thus, the composition (ratio between mannuronic and guluronic acid blocks, M/G), sequence and length of blocks as well as polymer molar weight determine the physical properties of alginate and its resulting hydrogels (Lee and Mooney, 2012).

Pectins are also anionic polymers and their structure presents a smooth region corresponding to the main linear backbone and consisting of α -1,4-linked and partly esterified D-galacturonic acid residues. The ratio of esterified to total galacturonic groups is termed as the degree of esterification (DE) or degree of methoxylation (Sriamornsak, 2003). When showing DE levels below 50%, it is considered as low methoxylation pectin and the mechanism of gelation requires the presence of bivalent cations (usually Ca^{2+}). Carboxyl groups from galacturonic residues from parallel or adjacent chains are linked intermolecularly through ionic bonding, following the egg-box model (Sriamornsak, 2003). Side chain composition, branching degree, molar weight and degree of esterification strongly affect the physico-chemical properties of pectins.

Pectin gels are extensively used in biomedical applications due to their easily tunable physical properties, high water association capacity and ability to act as carrier of proteins, drugs or cells. A number of studies report the development of materials consisting of pectin in combination with chitosan (Martins *et al.*, 2018a; Maciel *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2013), mostly directed to drug delivery applications. However, chitosan-pectin-based

materials are not fully exploited for the use in tissue repair and regeneration, and there are only few publications in which they are directed for application as tissue engineering scaffolds (Coimbra *et al.*, 2011; Archana *et al.*, 2013; Liu, *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2018b).

As an additional way of tuning the properties of biomaterials, polymeric additives capable of altering the materials porosity and mechanical properties, two key features for the design of tissue engineering scaffolds, are also introduced in the studied systems. The first is the surfactant Kolliphor® P188 (K), a porogenic agent previously studied to increase the porosity of chitosan-alginate (Bueno *et al.*, 2014) and chitosan-xanthan (Westin *et al.*, 2017) matrices. When added to the polymeric mixture, the surfactant acts forming a stable foam that originates pores throughout the matrix. The second additive is the elastomer Silpuran® 2130 A/B (S), already studied as a component in chitosan-alginate matrices capable of improving their mechanical properties (Pires and Moraes, 2015). This compound is a biocompatible polydimethylsiloxane (PDMS) and consists of two components (A and B) with functional groups and auxiliaries for additional crosslinking mediated by a platinum catalyst. The catalyst may also bind to compounds containing amino groups and promote extra crosslinking of chitosan chains, reinforcing the polymeric structure (Colas and Curtis, 2004; Pires and Moraes, 2015).

This work reports a comparative study between chitosan-based matrices prepared by complexation of chitosan of two different molar weights with two different polyanions, alginate and pectin, in the presence or absence of the additives S and K. It envisages the development of polymeric systems with varying physico-chemical and mechanical properties and thus capable of functioning as scaffolds in different applications in tissue engineering. The study focuses on the investigation of the capability of pectin to improve the mechanical properties of the studied materials, highlighting the potential use of this yet underexplored polysaccharide in the field of tissue engineering.

3.2.3. Materials and Methods

3.2.3.1. Materials

Chitosan-based scaffolds were prepared using chitosan from animal origin obtained from Sigma-Aldrich. Chitosan of high molar weight (ChH, with deacetylation degree, DD, of 76 % and viscosity-average molar weight, M_v , of 1002 kDa) and medium molar weight (ChM, DD of 81 % and M_v of 372 kDa) were used. Medium viscosity sodium alginate from brown algae

(A, viscosity of 2900 cps at 2% and 25 °C, M/G of 1.56 and M_v of 94.35 kDa), pectin from citrus peel (P, galacturonic acid content of 80.2 %, methoxylation degree of 7.6 % and M_v of 46.18 kDa) were also obtained from Sigma-Aldrich. The surfactant Kolliphor® P188 (Sigma-Aldrich) and the silicone gel Silpuran® 2130 A/B (Wacker Chemie AG) were also used.

3.2.3.2. *Scaffolds preparation*

Chitosan-alginate and chitosan-pectin matrices were prepared according to adaptations of the procedures described by Bueno *et al.* (2014) for porous formulations, and Pires and Moraes (2015) for formulations with silicone. Briefly, chitosan solution at concentration 1 % w/v (in aqueous acetic acid solution, 1 % v/v), alginate aqueous solution at 0.5 % w/v and pectin aqueous solution at 2 % w/v were prepared. Chitosan solution was mixed with alginate or pectin solutions at 1:1 mass ratio and final volume of 540 mL. For porous formulations, Kolliphor® P188 was added at the proportion of 10 % w/w in relation to the mass of polysaccharides. Primary crosslinking of alginate or pectin was performed by addition of 7.2 mL of a 2% w/v CaCl_2 aqueous solution and neutralization of the polymeric mixture was achieved by addition of 2 M NaOH aqueous solution. Silpuran® 2130 A/B was added at the proportion of 10 % w/w at the end of the mixing step. The mixture was transferred to four polystyrene Petri dishes of 15 cm diameter and solvent casting was performed for 24 or 36 h at 37 °C, for dense or porous formulations, respectively. Scaffolds were then immersed in 2% w/v CaCl_2 solution (for secondary crosslinking) and subsequently washed with water and 10 mM HEPES buffer. Final drying was performed at room temperature for 24 hours. For the biological testing, the scaffolds were disinfected by exposure to ethanol solution (70 % v/v) overnight.

3.2.3.3. *Scaffolds characterization*

3.2.3.3.1. *Physico-chemical characterization*

The morphology of surface and cross section was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) (LEO 440i, Leica). Samples were stored in a desiccator and then metalized with a thin layer of gold (92 Å) (SC 7620, Mini Sputter Coater). The average pore size was measured by analyzing SEM images of porous scaffolds with the Image J software.

The porosity (P, %) of porous formulations was calculated according to Equation 1:

$$p = \left(1 - \frac{\rho_{\text{apparent}}}{\rho_{\text{material}}}\right) \times 100 \quad (1)$$

where ρ_{apparent} (g/cm³) is the apparent density, calculated as the ratio between mass and volume of the sample, and ρ_{material} (g/cm³) is the real density measured by helium pycnometry (Accupyc 1330 Micromeritics).

Thickness of dry scaffolds was measured with a digital micrometer (MDC-25S, Mitutoyo) at ten different positions. The thickness of wet samples was measured after exposing the scaffolds to water or PBS (phosphate-buffered saline) for 24 h.

Surface roughness, expressed as the root mean square roughness, Rq, was evaluated using a portable rugosimeter (SJ-210, Mitutoyo) with cutoff set in 0.8 mm and total length in 5 mm, and is reported as an average of ten measurements.

3.2.3.3.2. *Behavior in aqueous media*

Surface wettability was assessed by depositing a 2 μ L drop of water on the surface of the scaffold and measuring immediately the static contact angle using a VCA-2500 XE™ contact angle apparatus (AST products Inc.). Ten replicates were performed for each formulation.

Liquid uptake capacity and stability of the scaffolds in water, PBS and culture medium were analyzed by gravimetry, according to the procedures described by Souza *et al.* (2017). The culture medium used was DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich).

In vitro biodegradation was assessed according to the procedure described by Freier *et al.* (2005), with slight modifications. Sterile samples of 1 cm x 1 cm, in triplicate, with known dry weights, were incubated in 1.5 mL of lysozyme (chicken egg white, L3790, Sigma-Aldrich) solution in PBS (pH 7.4, 37 °C) at a concentration of 1.5 μ g/mL. Samples were kept under mechanical agitation in a shaker plate (100 rpm) for 25 days. Lysozyme solution was changed after 5 and 10 days. Percentage of mass loss was assessed by gravimetry. Discrimination between enzymatic degradation and dissolution was evaluated by incubating control samples in PBS without lysozyme throughout the same period.

3.2.3.3.3. *Mechanical properties*

The stress relaxation behavior of scaffolds in unconfined compression conditions was performed on disk-shaped samples placed in a PBS bath. Initially, samples (n=3) with nominal diameter of 10 mm were swollen in PBS and their final diameter was determined using a laser micrometer (Lasermike 183-04, Techmet). Wet samples were then compressed to up to 40% of their original thicknesses by using a 25 mm diameter compression plate attached to a 150 gf (for porous formulations) or a 7 N (for dense formulations) load cell (Mach 1, Biomomentum). Four ramps of 10 % deformation at a rate of 0.05 mm/s were applied. The relaxation time at each ramp was set to 2000 s for dense formulations and 5000 s for porous formulations in order to obtain a steady value for the load (residual load). Induced force was recorded as a function of time and the stress (nominal) was calculated by taking into account the sample's cross section (nominal) and the residual load. Stress-strain curve fitting was performed using Equation 2, which describes the typical concave-upward shape of stress-strain data from mechanical tests on soft tissues (Lee, 2006):

$$\sigma = \frac{1}{\beta} (C e^{\beta \varepsilon} - \gamma) \quad (2)$$

where σ is the stress value, ε is the strain, and C , β , and γ are empirical constants. The elastic moduli of the scaffolds were calculated using the first derivative of the stress-strain curve at 20 % and 40 % strain.

To assess the poroviscoelastic behavior of the scaffolds, samples of nominal diameters of 6, 10 and 15 mm were used. The specimens were subjected to a ramp of 50 % deformation and relaxation time was set to 43200 s. All other testing parameters remained unaltered. The results are presented as plots of L/a^2 vs. t , where L is the induced force (normalized to the maximum value measured), a is the radius of the sample and t is the relaxation time.

3.2.3.3.4. *Indirect cytotoxicity*

The *in vitro* indirect cytotoxicity of the scaffolds to primary human dermal fibroblasts (HDF cells, ATCC) was assessed by exposing cells to extracts of the materials and subsequently determining cell viability, according to the guidelines of ISO 10993-5/2009.

For obtaining the extracts, samples were previously swollen and then incubated for 24 h (37 °C, 5 % CO₂) with culture medium at a proportion of 0.05 g of dry material per mL.

HDF cells were cultured in supplemented DMEM and seeded in a 96-well plate at a density of 20000 cells/cm². After 24 h of culture, the formation of a subconfluent monolayer was observed. Cells were then washed once with PBS and incubated with 100 µL of the extracts (n=8) for 24 h (37 °C, 5 % CO₂). After the incubation period, cells were again washed with PBS and 150 µL of resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich) solution (250 mg/L in PBS, diluted in standard culture medium at 10 % v/v) was added. Cells were again incubated for 4 h. Standard culture medium was used as a negative control and 1% (v/v) Triton[®] X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS as a positive control of toxicity. After incubation, 100 µL aliquots of each well were collected and transferred to another 96-well plate. Fluorescence was determined at 544 nm excitation and 590 nm emission using a spectrophotometer (SpectraMax i3x, Molecular Probes). Results are expressed setting the fluorescence of the negative control (untreated cells) as 100% of metabolically active cells. Three independent experiments were performed.

3.2.3.4. *Statistical analysis*

The results obtained were analyzed using the Tukey test to determine statistically significant differences among averages at 95% confidence limits with the Software Statistica 7.0.

3.2.4. *Results and discussion*

3.2.4.1. *Physico-chemical characterization*

The morphological aspect of chitosan-alginate and chitosan-pectin scaffolds produced with high or medium molar weight chitosan in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B and Kolliphor[®] P188 is shown in Figure 1.

The surface of all scaffolds produced without the additives is slightly rough and, apparently, the formulations with alginate (ChH-A and ChM-A) are smoother than formulations with pectin (ChH-P, ChM-P), according to Figure 1. Fibers can be observed on the surfaces, being a consequence of the coacervates formed during polymer mixture. A compact lamellar structure is observed in the cross-section, attributed to the stacking of polymer complexes resulting from organization of polymer chains in the matrix (Souza *et al.*, 2016).

The morphology of formulations containing Silpuran[®] 2130 A/B (ChH-A-S, ChM-A-S, ChH-P-S, ChM-P-S) substantially changes in comparison to formulations without silicone, since droplets of the compound are present and heterogeneously spread on biomaterials surface

(Figure 1). Due to its lipophilic character, the elastomer has low solubility in the hydrophilic polymeric mixtures (chitosan-alginate and chitosan-pectin), and, as consequence, it is dispersed through the matrix as aggregates. In addition, according to Pires and Moraes (2015), due to the high viscosity of the polymeric complex, air bubbles may be entrapped within the matrix and contribute to the dispersion of the silicone as droplets. In fact, for the more viscous formulations produced with chitosan of higher molar weight (ChH-A-S and ChH-P-S), a higher proportion of silicone droplets is observed on the surface. Besides, air bubbles can be found in these materials due to the reduced efficiency of their deaeration.

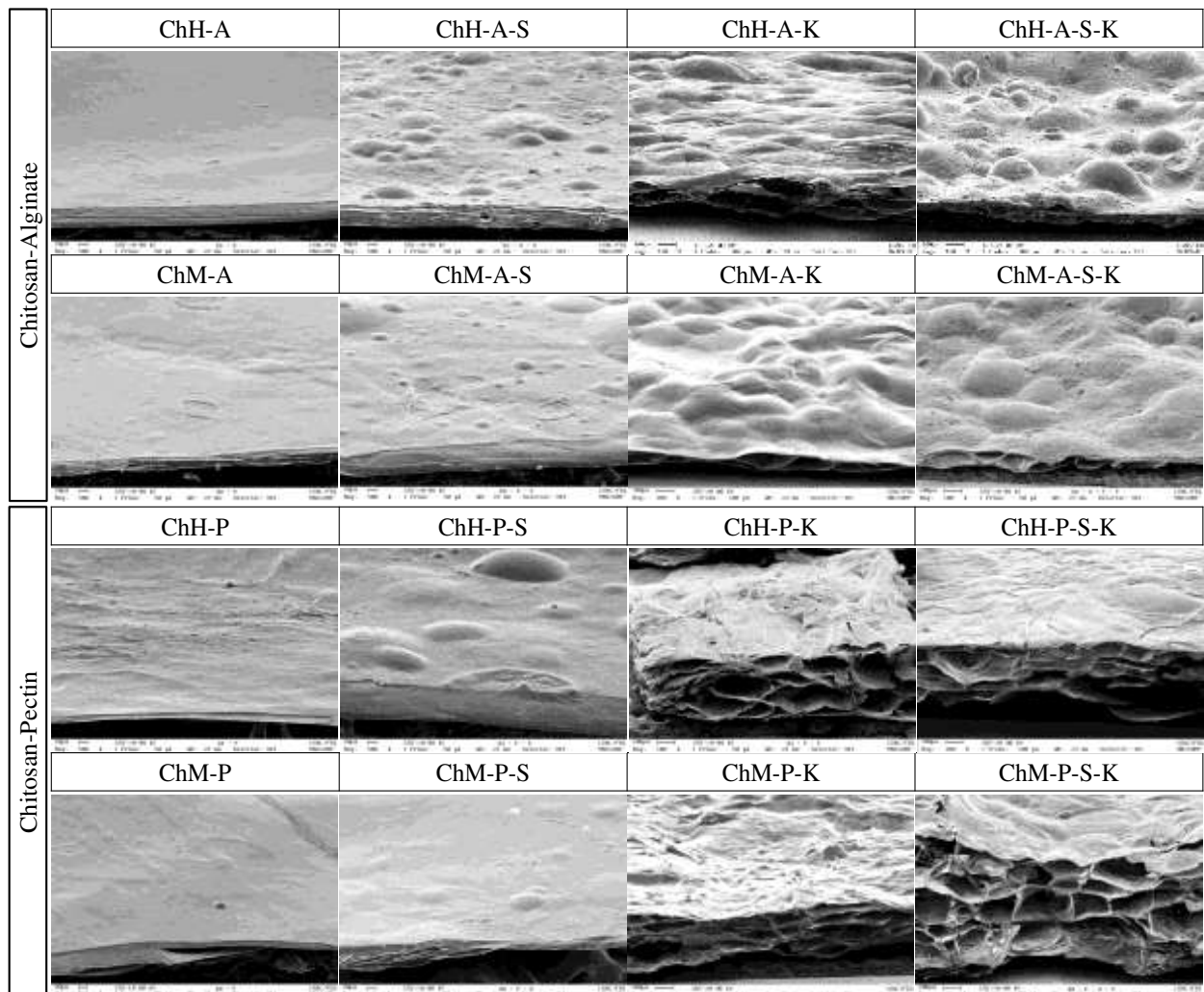


Figure 1: Surface and cross section aspect evaluated by SEM of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) with chitosan of high (ChH) or medium (ChM) molar weight.

The use of the surfactant Kolliphor[®] P188 originated materials with pores (ChH-A-K, ChM-A-K, ChH-P-K, ChM-P-K, ChH-A-S-K, ChM-A-S-K, ChH-P-S-K, ChM-P-S-K) due to intensive foam formation during polymer mixture. According to Bueno *et al.* (2014), polar blocks of Kolliphor[®] P188 (polyoxyethylene chains) interact with water and the polysaccharides, and the non-polar block (polyoxypropylene chain) stabilizes the air bubbles trapped in the matrix, promoting structural integrity of the material while solvent molecules evaporate from the liquid film that constitutes the foam. Besides, the authors mention that foam stability is also attributed to the high viscosity of the system (which increases during drying) and the strong association between the polymers.

The micrographs of the porous scaffolds show that formulations containing pectin present higher amount of pores when compared to those produced with alginate. Indeed, the calculated porosity of the matrices containing Kolliphor[®] P188, shown in Table 1, corroborates this observation. Scaffolds containing pectin present, in general, higher porosity than formulations with alginate (78.4 to 83.3% and 62.0 to 78.7%, for pectin and alginate formulations, respectively). Because of the higher viscosity of the chitosan-pectin mixture, higher amount of air is entrapped within the matrix, what explains the higher porosity. Bueno *et al.* (2014) produced chitosan-alginate scaffolds with different proportions of surfactant (Pluronic F68[®], equivalent to Kolliphor[®] P188) and reported higher porosity for formulations in which higher amount of surfactant was added. When the amount of 10% (w/w) was used (the same of the present work), the porosity of the final material was 84%.

Despite the inherent variability of the natural biopolymers used and also of scaffold heterogeneities in thickness associated to the casting production process, mostly in those containing Silpuran[®] 2130 A/B, as discussed ahead, the accuracy of the porosity determination procedure was considered as adequate.

For formulations produced with Silpuran[®] 2130 A/B (ChH-A-S-K, ChM-A-S-K, ChH-P-S-K, ChM-P-S-K), silicone droplets can be observed at the surface of the matrices and also at the pore walls. These droplets are smaller than those observed for formulations without surfactant and more homogeneously dispersed on the surface. The presence of silicone significantly reduced the porosity of porous chitosan-alginate materials, but this decrease in porosity was not observed for porous chitosan-pectin scaffolds. According to Bergeron *et al.* (1997), polydimethylsiloxane antifoams, which is the case of Silpuran[®] 2130 A/B, may act

following two different mechanisms: thinning of the liquid film present between pores as consequence of silicone spreading along the water-polysaccharide/air interface, or by promoting capillary instability due to lodging of silicone droplets in the interface, leading to the rupture of the film and consequent pore collapse. Probably, in the case of chitosan-pectin based formulations, the viscosity of the system is high enough to maintain foam stability.

Table 1: Pore size, porosity and real density of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of the additives Silpuran® 2130 A/B (S) and Kolliphor® P188 (K) with chitosan of high (ChH) or medium (ChM) molar weight.

Formulation	Pore size (μm)	Porosity (%)	Real density (g/cm^3)
ChH-A	-	-	1.864 ± 0.027^a
ChH-A-S	-	-	1.871 ± 0.007^a
ChH-A-K	$798 \pm 109^{a,c}$	$70.5 \pm 2.5^{a,c}$	0.208 ± 0.002^b
ChH-A-S-K	$566 \pm 216^{a,b}$	65.9 ± 1.5^a	0.677 ± 0.005^b
ChM-A	-	-	1.864 ± 0.009^a
ChM-A-S	-	-	1.712 ± 0.008^d
ChM-A-K	368 ± 85^b	$78.7 \pm 0.5^{c,d}$	0.316 ± 0.001^e
ChM-A-S-K	479 ± 105^b	62.0 ± 6.8^a	1.151 ± 0.005^f
ChH-P	-	-	1.574 ± 0.008^g
ChH-P-S	-	-	1.631 ± 0.005^h
ChH-P-K	$566 \pm 134^{a,b}$	$78.4 \pm 4.4^{c,d}$	0.299 ± 0.001^e
ChH-P-S-K	880 ± 241^c	83.3 ± 0.3^d	0.754 ± 0.001^i
ChM-P	-	-	1.395 ± 0.006^j
ChM-P-S	-	-	1.580 ± 0.010^g
ChM-P-K	$588 \pm 273^{a,b}$	$78.8 \pm 2.2^{c,d}$	0.643 ± 0.038^k
ChM-P-S-K	518 ± 126^b	80.6 ± 0.7^d	0.872 ± 0.005^l

Different letters in the same column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

The porosity of the material is a key factor for adequate performance as a scaffold for cell growth and proliferation. High porosity and adequate pore size, distribution and interconnectivity facilitate cell ingrowth, diffusion of nutrients, oxygen and metabolites as well as neovascularization of the construct (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). As mentioned before, all formulations studied present high porosity (62.0 to 83.3%) and the pore sizes range between 368

to 800 μm (Table 1). Different ranges of pore size are suitable for specific types of cells and cellular activities, for example angiogenesis, adipogenesis, chondrogenesis, osteogenesis, skin regeneration or cell infiltration and proliferation. For improved vascularisation of constructs, it has been demonstrated that pore sizes greater than 300 μm are desirable (Murphy and O'Brien, 2010). Bueno and Moraes (2011) produced chitosan-alginate matrices using the surfactants Pluronic F68[®] and Tween 80[®] and obtained similar structures to those shown in the present study, with average pore size between 90 and 300 μm , adequate for the treatment of skin lesions. Coimbra *et al.* (2011) fabricated porous chitosan-pectin scaffolds for bone tissue engineering application, reporting pore sizes of up to 500 μm and demonstrating satisfactory osteoblast adhesion and proliferation on the biomaterials. Considering these data, it is possible to infer that the porous structure of the materials herein studied may be suitable for cell ingrowth.

Table 1 also shows the real density of the scaffolds fabricated in the present study. Formulations produced without Kolliphor[®] P188 present real density ranging from 1.395 to 1.871 g/cm^3 , with higher values for formulations with alginate. As expected, the introduction of air in the structure of the matrices produced in the presence of surfactant reduced the real density of these materials. However, porous formulations with Silpuran[®] 2130 A/B are denser than the respective formulations without silicone. After solvent evaporation, retraction of the materials produced with Silpuran[®] 2130 A/B and Kolliphor[®] P188 was observed, *i. e.*, the diameter of these scaffolds was reduced. It means that, in these cases, materials with higher mass per volume ratio were obtained. The shrinkage of the scaffolds may be attributed to the crosslinking process associated to the reticulation of the components of Silpuran[®] 2130 A/B mediated by a platinum catalyst. Besides, according to Colas and Curtis (2004), shrinkage of silicone chains may occur due thermal expansion during curing of the elastomer components at conditions above room temperature, as that used during the solvent evaporation (37 °C). Also, the platinum catalyst in the Silpuran[®] 2130 A/B formulation may bind to amino groups, which would contribute to the formation of more stable chitosan-based complexes (Pires and Moraes, 2015).

Despite the shrinkage of the scaffolds caused by the silicone, higher density of materials containing the elastomer compared to equivalent formulations prepared without this compound was observed only for porous formulations. For dense formulations, there is no significant difference between materials with or without the elastomer. This behavior can be explained by the volumetric expansion observed for dense formulations during the washing step

of scaffold fabrication, which decreased final mass per volume ratio of the materials.

The thicknesses of dry scaffolds and of scaffolds swollen with PBS are shown in Table 2. Thickness is an important characteristic of the biomaterial since it affects other important properties, such as mechanical resistance or permeability, for example. Moreover, analyzing the thickness of the materials after immersion in liquid is relevant because it represents the condition in which the scaffold will be used in clinical applications. Ideally, the thickness of tissue engineered scaffolds should be comparable to that of the native tissues.

Table 2: Thickness of dry samples and samples swollen with PBS, roughness (Rq parameter) and water contact angle (WCA) of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of the additives Silpuran® 2130 A/B (S) and Kolliphor® P188 (K) with chitosan of high (ChH) or medium (ChM) molar weight.

Formulation	Thickness (μm)		Roughness (μm)	WCA (degrees)
	Dry	PBS		
ChH-A	55.8 ± 8.4 ^a	1266.7 ± 57.7 ^{a,b}	1.0 ± 0.4 ^a	52.4 ± 7.1 ^{a,d}
ChH-A-S	81.8 ± 27.8 ^a	1300.0 ± 0.0 ^{a,b}	5.4 ± 1.0 ^{b,c}	79.1 ± 7.6 ^b
ChH-A-K	229.7 ± 29.9 ^{a,b}	1840.0 ± 181.7 ^{c,d}	8.9 ± 3.4 ^{b,d}	40.9 ± 7.4 ^c
ChH-A-S-K	281.4 ± 74.4 ^{b,c,d}	1440.0 ± 260.8 ^{b,e,f}	8.0 ± 2.0 ^{b,e,g,k}	57.8 ± 10.7 ^d
ChM-A	51.5 ± 10.0 ^a	1077.4 ± 16.6 ^{a,e}	1.3 ± 0.4 ^{a,f}	44.9 ± 3.9 ^{a,c}
ChM-A-S	116.2 ± 23.9 ^{a,b}	1029.7 ± 73.8 ^a	4.5 ± 0.8 ^{a,c,e,j}	77.1 ± 11.0 ^{b,f}
ChM-A-K	414.2 ± 65.8 ^{b,d,e}	1709.7 ± 223.9 ^{c,f}	9.7 ± 1.5 ^{d,g,h}	36.8 ± 5.7 ^{c,g}
ChM-A-S-K	371.5 ± 134.8 ^{b,d,e}	1142.4 ± 225.7 ^{a,b}	8.9 ± 2.1 ^{b,e,h,k}	45.3 ± 6.1 ^{a,c,g}
ChH-P	135.3 ± 23.2 ^{a,c}	506.7 ± 103.8 ^g	3.0 ± 0.5 ^{a,c,f}	98.4 ± 5.9 ^e
ChH-P-S	125.1 ± 15.3 ^{a,c}	482.0 ± 95.2 ^g	4.2 ± 0.8 ^{a,c,i,j}	95.7 ± 10.7 ^e
ChH-P-K	606.3 ± 228.5 ^f	2166.7 ± 57.7 ^{d,h}	12.5 ± 3.9 ^{d,h}	74.5 ± 4.8 ^{b,f}
ChH-P-S-K	505.4 ± 139.8 ^f	1416.7 ± 160.7 ^{a,b,f}	4.8 ± 1.5 ^{e,f,j}	97.3 ± 8.4 ^e
ChM-P	132.0 ± 19.6 ^{a,c}	468.1 ± 105.4 ^g	4.2 ± 0.7 ^{a,c,j}	90.6 ± 3.7 ^e
ChM-P-S	131.3 ± 16.2 ^{a,c}	430.6 ± 67.9 ^g	3.8 ± 1.1 ^{a,c,j}	101.6 ± 4.0 ^e
ChM-P-K	1000.6 ± 289.8 ^g	2273.5 ± 277.0 ^h	10.4 ± 1.7 ^{d,l}	70.4 ± 9.5 ^b
ChM-P-S-K	438.5 ± 211.8 ^{d,f}	1212.6 ± 170.6 ^{a,b}	6.9 ± 2.2 ^{b,g,i,j,k,l}	76.6 ± 8.6 ^b

Different letters in the same column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

According to Table 2, there is no significant difference between thicknesses of dry scaffolds produced with alginate containing or not the additive Silpuran® 2130 A/B. Pires and

Moraes (2015) obtained chitosan-alginate membranes with similar thickness (57 μm), however, in contrast to the present work, the authors reported decrease of membrane thickness when silicone was added.

As expected, formulations produced with alginate in the presence of the surfactant Kolliphor[®] P188 are thicker than the respective formulations without this additive due to the introduction of air and the presence of pores in these matrices. Thicknesses of porous chitosan-alginate based formulations ranged from 229.7 to 414.2 μm . Bueno *et al.* (2014) produced porous chitosan-alginate scaffolds with higher thickness (500 μm), probably due the fact that the authors used chitosan of higher molar weight, with higher viscosity, which leads to the retention of higher amount of air within scaffold structure. Analogously to dense formulations, the addition of silicone to porous formulations did not alter the thickness of the final dry material in comparison to the corresponding formulations without this additive.

Similar behavior was observed for chitosan-pectin based scaffolds. Porous formulations are thicker than formulations produced without surfactant and the addition of silicone did not lead to significant change in this property. However, formulations containing pectin are thicker than formulations with alginate. Martins *et al.* (2018a) obtained thinner chitosan-pectin membranes, with thicknesses of 43 or 29 μm for neutralized or non-neutralized formulations, respectively. Differently from the present study, the authors used very low molar weight chitosan (87 kDa) combined with pectin of high methoxylation degree (56%) and molar weight of 190 kDa, without adding an ionic crosslinking agent during membrane preparation.

After immersion in PBS, thickness of all formulations increased from 3 to 23 times, depending on scaffold composition and porosity. For chitosan-alginate based formulations, for example, an increase of 9 to 23 times was observed for dense formulations. The highest values were attained for materials prepared with chitosan of high molar weight. For chitosan-pectin based formulations, an increase of 3 to 4 times was attained for dense materials. In general, the thicknesses of porous matrices did not increase as much as that of dense materials after immersion in PBS. However, porous scaffolds are still thicker than their respective dense formulations, with thicknesses ranging from 1142.4 μm (for ChM-A-S-K) to 2273.5 μm (for ChM-P-K). These results can be related to the liquid uptake capacity of these materials, which will be presented in section 3.2.

Surface properties of the scaffolds can affect and control cell adhesion and

proliferation. Together with their chemical composition and structure, they may influence material biocompatibility and limit the range of its clinical applications (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Roughness and wettability (water contact angle) of the chitosan-alginate or chitosan-pectin based scaffolds were evaluated and the results are also shown in Table 2.

Porous formulations produced in the presence of Kolliphor® P188 are, in general, rougher than formulations produced without the surfactant, with Rq values ranging from 4.8 to 12.5 μm and 1.0 to 5.4 μm for porous and dense formulations, respectively. Indeed, surface irregularities resulting from the presence of air entrapped inside the porous matrices can be observed in the micrographs shown in Figure 1. Bierhalz *et al.* (2016) reported the same behavior for porous chitosan-alginate matrices produced with the same surfactant, with roughness of 9.97 μm against 1.99 μm for non-porous formulations.

Chitosan-alginate dense scaffolds containing Silpuran® 2130 A/B (ChH-A-S and ChM-A-S) are significantly rougher than the correspondent formulations without silicone. However, introduction of this additive did not influence the roughness of dense formulations containing pectin. As shown in Figure 1, Ch(H or M)-A-S scaffolds have considerably more silicone droplets dispersed on the surface than Ch(H or M)-P-S matrices, what contributes to increase the roughness observed for the first formulations.

Microscale roughness is defined when irregularities on the material surface range from 100 nm to 100 μm (Bacakova *et al.*, 2011), which is the case of all scaffolds herein studied. In this case, the effect of roughness on cell behavior is controversial, since surface topography can restrict cell attachment and proliferation but at the same time affects or stimulates cell activity, *e.g.*, inducing neural or osteogenic differentiation (Gulseren *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016).

Surface wettability is influenced by both surface chemistry and roughness, among other properties. In turn, the impact of surface wettability on cell attachment is attributed to the type, conformation and binding strength of adsorbed molecules originated from culture or physiological media, such as the proteins fibronectin, vitronectin, collagen and laminin (Guo *et al.*, 2017). If the surface is too hydrophobic, cell-adhesion-mediating proteins will adsorb in a denatured form, therefore presenting unsuitable conformation for binding cell attachment receptors (integrins) (Guo *et al.*, 2017). In the case of moderately hydrophilic surfaces, proteins adsorb in a more flexible form, which favors their reorganization by cells and improves cell adhesion (Bacakova *et al.*, 2011).

According to data shown in Table 2, formulations containing alginate are more hydrophilic than formulations with pectin, with WCA ranging from 36.8° to 79.1° and 70.4° to 101.6°, for alginate and pectin based formulations, respectively. Most formulations can be considered moderately hydrophilic, since their WCA are below 90°.

In general, WCA increases when silicone is present due to the hydrophobic characteristic of this compound and, as seen in the micrographs shown in Figure 1. Besides, scaffolds prepared with Kolliphor® P188 present higher hydrophilicity, *i.e.*, lower WCA than formulations free of the surfactant. This can be attributed to surfactant remaining in the matrix even after washing is performed during scaffold fabrication. Bierhalz *et al.* (2016) produced porous chitosan-alginate membranes using Poloxamer 188 (equivalent to Kolliphor® P188) as a porogenic agent and a methodology similar to the one used in the present study. The presence of residual surfactant in the final material was detected by thermogravimetric analysis. Due to the presence of ether groups in Kolliphor® P188, dipole-dipole interactions with water may occur if this compound is present on the biomaterials surface, resulting in contact angle reduction.

3.2.4.2. *Uptake capacity and stability in aqueous media*

The evaluation of the scaffolds properties in aqueous media is important because it can provide information about the behavior of these materials in clinical application conditions. Swelling of the material prior to use is often necessary, as when implanted in the patient or even when handled by medical professionals, for example. Testing in PBS is relevant because it can simulate the behavior of the scaffold in blood-contacting applications, since blood pH is similar that of the buffer (7.4). Table 3 shows the uptake capacity and mass loss in water or PBS for the Ch-A and Ch-P based materials.

Most of the formulations present higher uptake capacity of PBS than water, except for ChH-P-K and ChM-P-S-K, which can uptake equal amounts of both media. In general, formulations containing alginate can uptake from approximately 3 to 10 times more PBS than water. Pectin-containing materials absorb about 1.5 to 4 times more PBS, and this behavior is more pronounced for dense formulations rather than porous. Probably, the higher uptake capacity of PBS in comparison to water is related to the chelation process of calcium ions by phosphate ions in the buffer solution. As a consequence, crosslinking between polyanion chains is reduced, leading to less compaction of matrix structure and favoring liquid penetration.

Bierhalz and Moraes (2016) analyzed the uptake capacity of chitosan-alginate based membranes exposed to water, PBS and culture medium, achieving similar results regarding higher uptake of PBS than of water for dense formulations. The authors fabricated membranes using different chitosan to alginate mass ratios (3:1, 1:1 and 1:3) and alginate of different viscosities, in the presence or not of Poloxamer® 188 as porogenic agent. For the formulations produced in analogous conditions to those used in the present work, *i.e.*, 1:1 mass ratio and medium viscosity alginate, water uptake capacity was reported as approximately 2.5 g/g and 20 g/g for dense and porous (10 % w/w Poloxamer® 188) formulations, respectively. In turn, PBS uptake capacity was 7 g/g and 19 g/g for dense and porous materials, respectively.

Table 3: Liquid uptake capacity and mass loss of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of Silpuran® 2130 A/B (S) and Kolliphor® P188 (K) with chitosan of high (ChH) or medium (ChM) molar weight, exposed to water or PBS.

Formulation	Liquid uptake (g/g _{scaffold})		Mass loss (%)	
	Water	PBS	Water	PBS
ChH-A	1.3 ± 0.1 ^{A,a}	10.4 ± 1.7 ^{B,a,b}	1.8 ± 0.2 ^{C,a}	39.3 ± 10.7 ^{D,a}
ChH-A-S	1.7 ± 0.1 ^{A,a}	9.0 ± 0.0 ^{B,a,c}	2.6 ± 0.5 ^{C,a}	36.1 ± 2.2 ^{D,a,b}
ChH-A-K	5.6 ± 0.6 ^{A,b}	- *	5.5 ± 0.5 ^{C,b}	35.2 ± 3.4 ^{D,a,b}
ChH-A-S-K	4.5 ± 0.2 ^{A,c}	15.0 ± 1.2 ^{B,d}	5.6 ± 0.5 ^{C,b}	33.0 ± 14.0 ^{D,a,b}
ChM-A	1.5 ± 0.1 ^{A,a}	14.4 ± 0.0 ^{B,d}	1.4 ± 0.3 ^{C,a}	36.8 ± 0.5 ^{D,a,b}
ChM-A-S	1.2 ± 0.0 ^{A,a}	11.5 ± 0.0 ^{B,b}	1.3 ± 0.2 ^{C,a}	80.4 ± 11.3 ^{D,c}
ChM-A-K	6.0 ± 0.2 ^{A,b}	- *	6.7 ± 1.9 ^{C,b,c}	71.2 ± 9.8 ^{D,c}
ChM-A-S-K	3.3 ± 0.8 ^{A,d}	21.7 ± 0.0 ^{B,e}	6.6 ± 0.9 ^{C,b,c}	42.3 ± 4.7 ^{D,a}
ChH-P	1.3 ± 0.0 ^{A,a}	4.1 ± 0.9 ^{B,f,g,h}	1.7 ± 0.3 ^{C,a}	10.4 ± 2.2 ^{D,d,e}
ChH-P-S	1.1 ± 0.0 ^{A,a}	3.2 ± 0.5 ^{B,f}	1.8 ± 0.3 ^{C,a}	4.6 ± 0.0 ^{D,e}
ChH-P-K	4.2 ± 0.2 ^{A,c,d,e}	5.4 ± 0.7 ^{A,B,g,h}	10.5 ± 0.2 ^{C,d}	9.3 ± 1.2 ^{C,e,f}
ChH-P-S-K	4.0 ± 0.4 ^{A,c,d,e}	5.7 ± 0.8 ^{B,g,h}	7.5 ± 1.7 ^{C,b,e}	13.4 ± 2.4 ^{D,e,f}
ChM-P	1.9 ± 0.1 ^{A,a}	7.3 ± 0.3 ^{B,c,h}	2.4 ± 0.1 ^{C,a}	8.6 ± 0.7 ^{D,e,f}
ChM-P-S	1.3 ± 0.0 ^{A,a}	3.2 ± 0.0 ^{B,f}	1.9 ± 0.1 ^{C,a}	9.2 ± 0.2 ^{D,e,f}
ChM-P-K	4.3 ± 0.0 ^{A,c,e}	6.1 ± 0.3 ^{B,h}	8.3 ± 0.5 ^{C,c,d,e}	13.0 ± 3.9 ^{C,e,f}
ChM-P-S-K	5.4 ± 0.1 ^{A,b}	5.9 ± 0.3 ^{A,h,i}	26.7 ± 1.7 ^{C,f}	21.8 ± 1.0 ^{D,b,d,f}

Different letters in the same row or column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). Lowercase letters refer to the comparison of data in the same column and capital letters refer to comparison of data in the same row, for the same property. *Not possible to determine precisely.

In general, there is no significant difference of water uptake capacity between correspondent chitosan-alginate and chitosan-pectin scaffolds (*e.g.*, comparing ChH-A and ChH-P or ChH-A-K and ChH-P-K). However, as mentioned before, chitosan-alginate based formulations can uptake more PBS than pectin-containing formulations. It is important to emphasize that it was not possible to precisely determine PBS uptake capacity of ChM-A-K and ChH-A-K formulations due to difficulty in removing excess liquid of these matrices prior to final mass determination. Moreover, the measure of liquid uptake may be subject to error, since a reasonable mass loss of the material may occur in the same period.

The mass loss of the scaffolds in water and PBS present a similar behavior to that observed for the uptake capacity. Higher mass loss was noticed for formulations incubated in PBS and the materials containing pectin are more stable in this medium than those containing alginate. The mass loss of chitosan-alginate based matrices ranged from 33 to 80%, with higher values for formulations produced with medium molar weight chitosan, while mass loss of chitosan-pectin based formulations ranged from about 5 to 22% in PBS after 7 days. Martins *et al.* (2018a) studied the degradability of chitosan-pectin membranes fabricated with different chitosan/pectin proportions and without an ionic crosslinking agent. Mass loss observed for the formulation prepared using 1:1 polymer mass ratio was 32% after 7 days in PBS.

3.2.4.3. *Mechanical properties*

Unconfined compression stress relaxation tests were performed to assess the mechanical behavior of the chitosan-based scaffolds. Stress relaxation is the decay in stress when a constant strain is applied to a material and is one of the mechanical features of viscoelastic materials. Viscoelasticity means that the mechanical behavior of the material is a result of two different contributions, elasticity (time-independent) and viscosity (time-dependent). The elastic component is related to the ability of the material of storing and returning energy during loading and unloading, while the viscous component is responsible for the dissipation of part of this energy (Lee, 2006).

Biological tissues present viscoelastic behavior due to their highly hydrated structures, especially in the case of soft tissues, such as blood vessels, skin and cartilage (Lee, 2006). Substrate stress relaxation exerts a substantial impact on cell behavior and function (Chaudhury *et al.*, 2015), thus, it is important for the engineered scaffold material to present this

characteristic. In stress-relaxing matrices, the resistance to cellular traction forces is expected to be relaxed over time due to flow and remodeling, dissipating the energy that cell-generated forces exerted on the material. Chaudhury *et al.* (2015), observed that cell spreading and proliferation increase on substrates with stress relaxation, compared with purely elastic substrates with the same initial elastic modulus.

Stress-strain curves for Ch-A- and Ch-P-based scaffolds are shown in Figure 2. All curves present a concave upward shape, reflecting the nonlinear relationship between applied load and sample deformation. Stress and strain present a nonlinear behavior in most of the biological and bioartificial tissues (Irastorza *et al.*, 2015). Many soft biological tissues undergo stiffening as they are increasingly deformed (Wen and Janmey, 2013). The strain-dependent increase in the elastic modulus allows tissues to respond adaptively to varying external mechanical conditions and prevent large deformations that could threaten their integrity (Wen and Janmey, 2013).

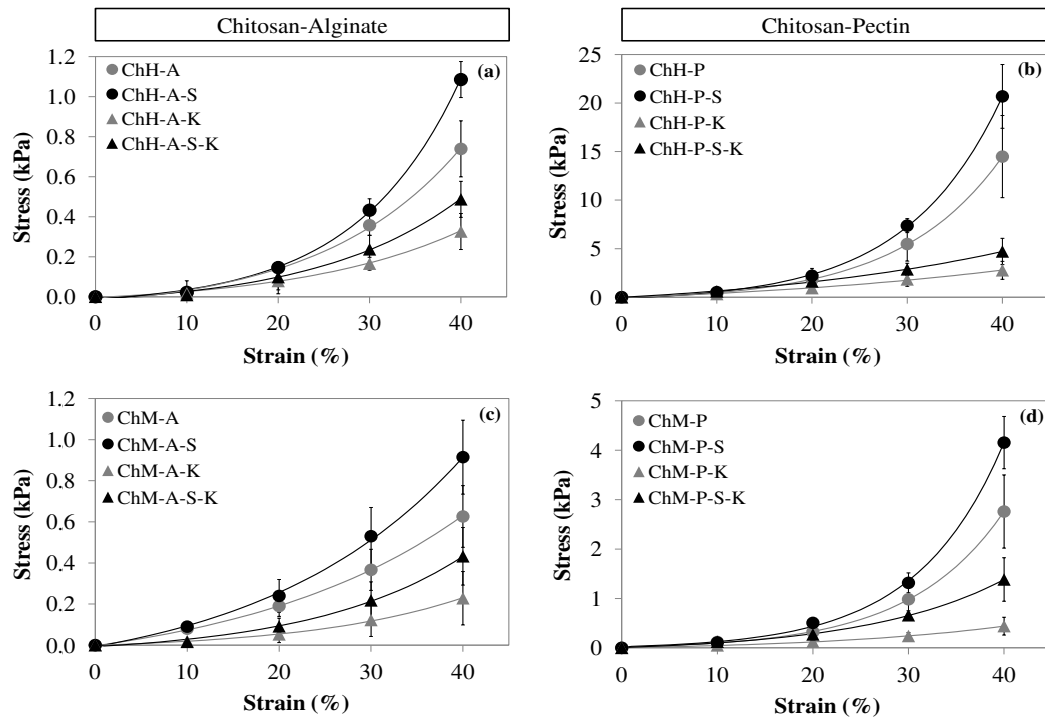


Figure 2: Stress-strain curves for (a, c) chitosan-alginate (Ch-A) and (b,d) chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) with chitosan of high (ChH) or medium (ChM) molar weight, submitted to compressive loads. Experimental data are shown with markers and the solid lines represent the fitted curves obtained using Equation 2. The R^2 value was higher than 0.9970 for all curves.

Table 4 shows the elastic modulus of all formulations calculated at the strains of 20% and 40%. The augment of the elastic modulus with the increase in sample deformation is verified for all formulations. In addition, the presence of the silicone compound increased the biomaterials elastic moduli when comparing to correspondent formulations prepared without this additive. Moreover, porous formulations present lower elastic moduli than correspondent dense formulations. The elastic modulus is higher for pectin- than for alginate-containing formulations prepared in the same conditions, being also higher for formulations prepared with high molar weight chitosan in comparison to the respective formulations prepared with medium molar weight chitosan.

Table 4: Elastic moduli of Ch-A and Ch-P scaffolds produced in the presence or absence of the additives Silpuran® 2130 A/B (S) and Kolliphor® P188 (K) with chitosan of high (ChH) or medium (ChM) molar weight in compression, at different strains.

Formulation	Elastic Modulus (kPa)	
	20% strain	40% strain
ChH-A	0.68	2.11
ChH-A-S	1.72	10.01
ChH-A-K	0.97	3.48
ChH-A-S-K	1.46	5.41
ChM-A	1.42	3.23
ChM-A-S	2.01	5.03
ChM-A-K	0.46	1.50
ChM-A-S-K	0.87	2.92
ChH-P	21.59	139.39
ChH-P-S	28.49	213.16
ChH-P-K	6.72	12.16
ChH-P-S-K	10.96	21.59
ChM-P	3.73	28.40
ChM-P-S	5.08	46.16
ChM-P-K	0.93	2.51
ChM-P-S-K	2.56	10.04

The elastic moduli of the studied materials ranged from about 0.7 to 210 kPa, depending on the strain considered and the characteristics of the polymers used on the different formulations. An example of the relevance of these values on a practical application in tissue

engineering is the substrate stiffness-dependent differentiation of mesenchymal stem cells. Engler *et al.* (2006) used polyacrylamide gels coated with collagen to interface human mesenchymal stem cells, which are known to be able to differentiate into neuron-like, muscle or bone cells.

The matrices presented different levels of stiffness, varying from very soft to moderately rigid, depending on the extent of the chemical crosslinking performed on their structures. The authors compared the elastic modulus of their materials in contact with the same culture medium to that of typical human tissues, such as brain (elastic modulus of ~1kPa), muscle (~10kPa) and collagenous bone (~100kPa), and found that soft matrices that mimic brain are neurogenic, while stiffer matrices that mimic muscle are myogenic, and comparatively rigid matrices that mimic collagenous bone proved to be osteogenic.

The elastic moduli of the materials with Silpuran[®] 2130 A/B increased up to 4.7 times for formulations with alginate (maximum increase in modulus for ChH-A-S in comparison to ChH-A) and 4 times for formulations with pectin (maximum increase for ChM-P-S-PI in comparison to ChM-P-PI). The improvement in mechanical properties of the polysaccharide-based scaffolds with the addition of silicone was already expected and reported in a previous work for chitosan-alginate matrices (Pires and Moraes, 2015). Although the presence of the silicone increased the elastic modulus of porous formulations, they still present lower mechanical resistance when compared to dense formulations.

To elucidate the better mechanical performance of pectin-containing formulations in comparison to correspondent alginate-containing formulations, the intrinsic properties of the polymers used to prepare the scaffolds, as well as the conditions of preparation, specifically molar ratios between chitosan and the polyanion, must be taken into account. Despite the mass ratios between pectin and chitosan and alginate and chitosan used to prepare the scaffolds are both 1:1, the molar ratio between pectin and chitosan is twice the ratio between alginate and chitosan, independently of the molar weight of the chitosan used. Besides, considering the galacturonic acid content of pectin and the amount of G groups (or guluronic acid content) of alginate, the amount of ionizable groups available for crosslinking with calcium ions is bigger for pectin than for alginate, which probably leads to more intense reticulation of chitosan-pectin matrices. The stronger mechanical properties of pectin-containing formulations can be considered as evidence that higher levels of crosslinking actually occurred in these matrices.

Moreover, considering also the conditions of preparation of the scaffolds, which

involved higher number of mols of ChM being used in comparison to ChH, and taking into account the deacetylation degree and molar weight of the different chitosans, the amount of ionizable groups of the polycation (deacetylated groups) available for interactions with alginate or pectin was almost the same for both medium and high molar weight chitosan. However, the organization of the chitosan structure varies for the different chitosans used, as well as the level of chain entanglement, which increases with polymer molar weight. Thus, the overall results for the mechanical behavior of high molar weight chitosan-containing formulations may be attributed to this particular feature of the polycation.

In a hydrogel, not only the structure and arrangement of polymers chains must be considered in the mechanical characterization, but also the presence of interstitial fluid within the matrix pores and lamellae. The deformation of gels is time-dependent and is a result of two concurrent molecular processes: conformational rearrangements of the network and solvent migration. The first results in the viscoelasticity of the gel and occurs due to sliding between the polymer chains, rotation of the joints between the segments of an individual chain and reversible crosslinks. The second refers to the poroelasticity of the material and may be linked to the diffusivity of the solvent through the matrix and the frictional drag of the interstitial fluid (Wang *et al.*, 2014).

In biological tissues, the micro structural arrangements accommodating macroscopic deformations have an impact on the internal distribution of stresses and consequently on how cells sense their microenvironment (Chandran and Barocas, 2004). The coexistence of both visco- and poroelasticity is important for the physiologic functions of many soft tissues, such as energy dissipation and storage, as well as load bearing and load transmission in cartilage or tendon and mechanical protection, sensing and homeostasis of skin (Oftadeh *et al.*, 2018).

According to Wang *et al.* (2014) visco- and poroelasticity can be assessed at different time scales in a mechanical test, as they prevail at different stages of the experiment. The experimental setup gives the sample length scale over which the solvent will migrate through the gel. In a compression test, the gel disk radius is several orders of magnitude bigger than the polymer mesh size, therefore, viscoelastic relaxation is not affected by sample length scale (Wang *et al.*, 2014). However, as the poroelastic stress relaxation is governed by migration of solvent molecules across the radius of the gel towards the external solvent, the time for the poroelastic relaxation increases with sample radius (Wang *et al.*, 2014). Therefore, by plotting the

ratio between the applied load and square radius of sample (L/a^2) versus time (t), it is possible to confirm that the larger the sample, the slower the relaxation of the poroelastic gel (Wang *et al.*, 2014).

Given the improved mechanical performance of formulations produced with chitosan of high molar weight and containing the silicone compound, as discussed above, these formulations were selected for the analysis of the poroviscoelasticity of the chitosan-based gels studied in this work. Figure 3 shows the L/a^2 versus t curves for the selected formulations.

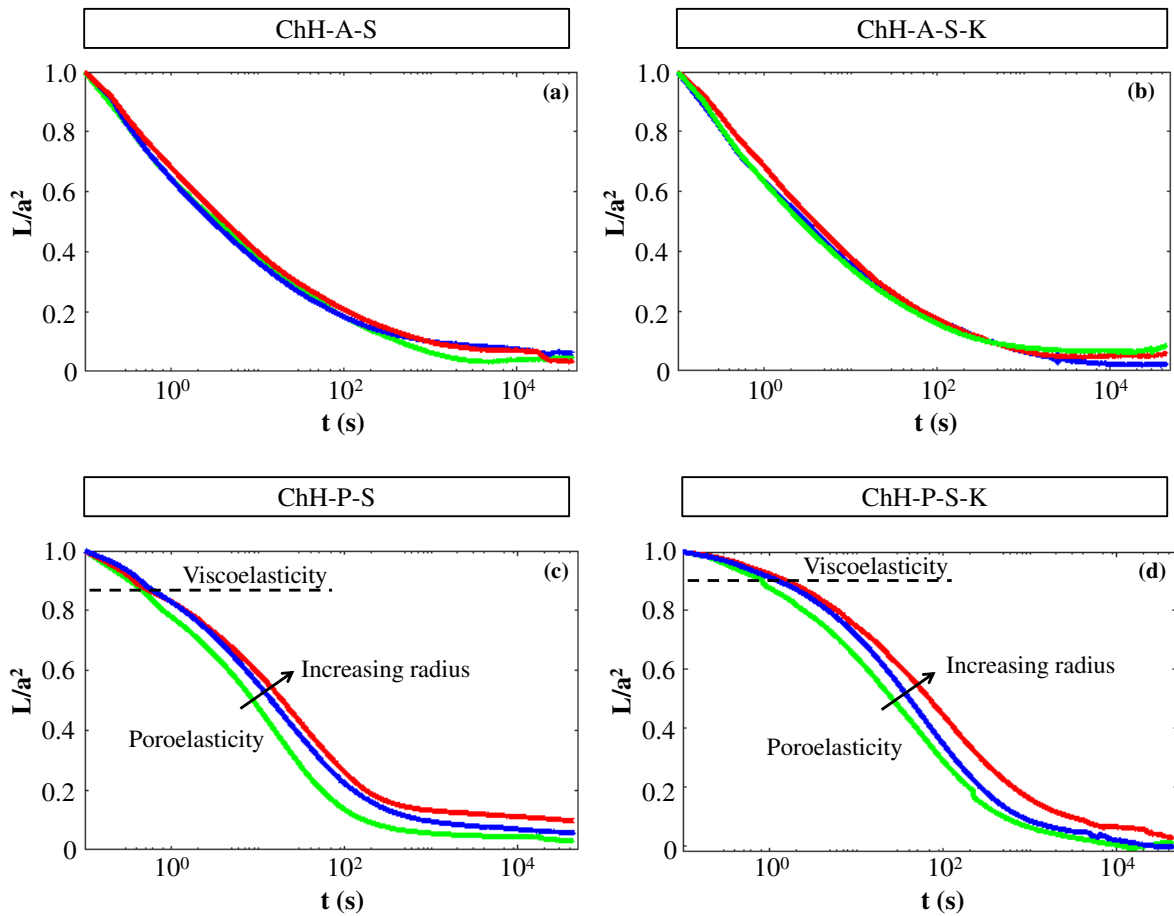


Figure 3: Poro-viscoelasticity assessment for (a, b) chitosan-alginate (Ch-A) and (c,d) chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced with Silpuran[®] 2130 A/B (S), in the presence or absence of Kolliphor[®] P188 (K), using chitosan of high (ChH) molar weight.

Figures 3a and 3b refer to alginate-containing formulations and both exhibit a purely viscoelastic profile. The curves for specimens of 6, 10 and 15 mm diameter overlap each other, meaning that relaxation is not affected by sample size. Pectin-containing formulations, by

contrast, shown in Figures 3c and 3d, present a combined profile of both visco- and poroelasticity. For these formulations, the curves of the three specimens with different diameters are adjacent at the initial portion of the experiment, indicating a viscoelastic behavior, but segregate from each other at later stages of the experiment, revealing in this case a poroelastic behavior. The relaxation of the samples with larger diameter, 15 mm, is slower than for samples with intermediate diameter, 10 mm, while faster relaxation is observed for samples with the smaller diameter, 6 mm. For both alginate-containing formulations, it took around 3.5 s for the gel to relax half of the stress, independently of sample size. For ChH-P-S (Figure 3c), the time necessary for the gel to relax half of the stress was of about 9, 14.5 and 19 s and for ChH-P-S-K (Figure 3d), the referred time was of approximately 26, 40 and 70 s for samples with diameters of 6, 10 and 15 mm, respectively. The longer relaxation times of ChH-P-S-K might be explained by its higher water content when compared to ChH-P-S. Even though the relaxation time studied was relatively long (12 hours), both pectin-containing formulations did not reach the equilibrium, which indicates that the process of solvent migration in these matrices plays a major role on their mechanical behavior.

Lainé (2017) studied the poro-viscoelastic behavior of porous gelatin scaffolds and observed the same profile of relaxation as the herein presented for pectin-containing formulations. The initial response of stress relaxation was governed by viscoelasticity and then a transition to poroelastic behavior was seen as the curves became separated from each other. The author compared the relaxation curves of gelatin to the relaxation curves of collagen gels, observing fully viscoelastic behavior for collagen. This behavior was explained by the free flow of water through the matrix, as the collagenous network rearrangements results in no mechanical resistance to the permeation of the fluid.

It is possible to assume that the higher level of crosslinking in pectin-containing formulations, when compared to alginate-containing scaffolds, resulted in matrices offering more resistance to water flow when compressed. In this sense, it is possible that an increase in pressure occurred in the system due to the difficulty of transport of the fluid from the center to the outmost layer of the gel, leading to an augmented response of the load during the stress relaxation test.

Zhao *et al.* (2010) performed stress relaxation tests with ionic or covalent crosslinked alginate hydrogels and observed that in gels with ionic crosslinks, relaxation occurred mainly due to breaking and subsequent reforming of the ionic crosslinks, and the time scale of the relaxation

was independent of the size of the sample. For gels with covalent crosslinks, on the other hand, stress relaxed mainly through migration of water, and the relaxation slowed down as the size of the sample increased. In the present work, both alginate- and pectin-containing hydrogels are ionically crosslinked, however, the supposedly stronger ionic interactions and higher density of crosslinks in pectin-containing gels resulted in a behavior similar to that observed by Zhao *et al.* (2010) for covalently crosslinked gels.

3.2.4.4. *Degradation studies*

As discussed previously, formulations produced with high molar weight chitosan and containing the silicone compound presented improved mechanical properties when comparing all formulations studied. Therefore, these formulations were selected for further characterization and, in the present and following sections, relevant aspects of the materials for application as tissue engineering scaffolds, such as uptake capacity and stability in culture medium, biodegradation in physiological-like solution and toxicity to human dermal fibroblasts were studied.

Table 5 shows the uptake capacity and mass loss in supplemented DMEM culture medium for dense and porous chitosan-alginate and chitosan-pectin scaffolds produced with Silpuran® 2130 A/B using chitosan of high molar weight.

Table 5: Uptake capacity and mass loss in DMEM culture medium and biodegradation in lysozyme solution for chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced with Silpuran® 2130 A/B (S), in the presence or absence of Kolliphor® P188 (K), using chitosan of high (ChH) molar weight.

Formulation	Uptake capacity (DMEM, g/g)	Mass loss (DMEM, %)	Biodegradation (25 days)	
			Mass loss (PBS, %)	Mass loss (lysozyme solution, %)
ChH-A-S	10.50 ± 1.28 ^a	11.59 ± 0.23 ^a	43.6 ± 6.1 ^{a,A}	45.3 ± 5.2 ^{a,A}
ChH-A-S-K	12.44 ± 0.75 ^a	17.84 ± 0.95 ^b	46.7 ± 2.4 ^{a,A}	45.9 ± 1.7 ^{a,A}
ChH-P-S	5.80 ± 0.42 ^b	4.76 ± 0.69 ^c	25.1 ± 1.9 ^{b,A}	25.0 ± 2.8 ^{b,A}
ChH-P-S-K	12.39 ± 0.58 ^a	23.48 ± 1.09 ^d	27.0 ± 4.1 ^{b,A}	31.1 ± 3.9 ^{b,A}

Different letters in the same column or row indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). Lowercase letters refer to the comparison of data in the same column and capital letters refer to comparison of data in the same row.

Dense chitosan-alginate formulation (ChH-A-S) can absorb more culture medium than the analogous formulation containing pectin (ChH-P-S), however, the porous formulation with alginate (ChH-A-S-K) uptakes culture medium similarly to the porous chitosan-pectin matrix (ChH-P-S-K). Moreover, DMEM uptake capacity of pectin-containing porous materials is significantly different from that of dense materials, but alginate-containing formulations show a different behavior. This can be attributed to the higher porosity of chitosan-pectin based matrices, reported as 83.3% for ChH-P-S-K, compared to 65.9% for ChH-A-S-K (see Table 1), which indicates their higher capacity of solvent accommodation inside the pores.

Bierhalz and Moraes (2016) reported a different behavior for chitosan-alginate matrices produced in analogous conditions to the present work, *i.e.*, using 1:1 mass ratio and medium viscosity alginate, but without adding the silicone compound. The uptake capacity of supplemented α -MEM culture medium was shown as approximately 7 g/g and 14 g/g for dense and porous (10 % w/w Poloxamer 188) formulations. In turn, mass loss in the same condition was about 28 % and 25 % for dense and porous materials, respectively.

In the present work, mass loss of scaffolds after 7 days in supplemented DMEM culture medium reflected their uptake capacity in this solution. ChH-P-S-K presents the highest mass loss, 23.5%, which can still be considered an acceptable level of degradation.

The evaluation of the biodegradation rate of a scaffold for tissue engineering applications is highly relevant, since the degradation of the material *in vitro* or *in vivo* should match neotissue formation. In addition, the scaffold degradation products should be nontoxic as well as easily metabolized and eliminated from the body (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Most of the naturally occurring polymers undergo enzymatic degradation and their degradation rate *in vivo* depends on the local availability and concentration of specific enzymes. Lysozyme and bacterial enzymes in the colon are the main enzymes involved in chitosan degradation in the human body. The degradation rate is inversely related to the crystallinity and to the degree of deacetylation of chitosan (Guarino *et al.*, 2015). Lysozyme is found at different concentrations in the human body and in this work, an enzyme solution with composition and pH close to those found in human serum was used.

The biodegradation of the scaffolds in terms of mass loss after 25 days is shown in Table 5. There is no significant difference between the mass loss in lysozyme solution and in PBS, for all formulations. This indicates that, during the period of analysis, the contribution of

the presence of the enzyme on the scaffolds degradation was negligible. This result can be explained by the relatively high degree of deacetylation (76%) of the high molar weight chitosan used to produce the scaffolds analyzed in this section.

The mass loss in the studied period was of about 45% and 25% for alginate- and pectin-containing formulations, respectively. This means that ChH-A-based formulations would degrade faster in comparison to the others. As briefly discussed above, the ideal degradation rate will depend on the targeted tissue to be regenerated. The recovery time of tendons can be used as an example of the time necessary for healing soft tissues. The late stages of healing of this tissue start from 6 to 8 weeks after injury and can last as long as 1 to 2 years, depending on the age and condition of the patient (Docheva *et al.*, 2015). In this case, a scaffold that degrades too fast could compromise mechanical and structural integrity of an implant before the tissue is sufficiently well developed. On the other hand, skin tissue healing can occur faster, in about 1 to 12 months (Gonzalez *et al.*, 2016).

3.2.4.5. *Indirect cytotoxicity*

The indirect cytotoxicity of the scaffolds to human primary fibroblasts is shown in Figure 4, in terms of cell viability normalized to the control of untreated cells.

The viability of cells exposed to the extracts of the scaffolds was equal or superior to the viability of the control of untreated cells, for all formulations evaluated, meaning that scaffold degradation or extraction products do not result in compounds toxic to cells. Considering that the resazurin assay used to assess cell viability in this test is a cell metabolism indicator, it is possible to infer that the amount of metabolically active cells was increased by the presence of compounds originated from the scaffolds.

It is important to emphasize that no bacterial contamination was observed when examining the scaffold samples and the wells seeded with HDF under optical microscopy. Moreover, cells did not show significant changes in their morphology after exposure to the degradation products of the samples.

Bierhalz *et al.* (2016) studied the cytotoxicity of dense and porous chitosan-alginate scaffolds to fibroblasts from human eyelid and observed less cytotoxic effect for porous formulations. Yan *et al.* (2001) evaluated the cytotoxicity of chitosan-alginate films prepared with chitosans of three different molar weights to mouse and human fibroblasts and observed that

the films were not cytotoxic to any of the formulations. The human fibroblasts retained more than 91% of their viability over a 4-day period of exposure to extracts of the samples. Tentor *et al.* (2017) studied the cytotoxicity of chitosan-pectin scaffolds, containing or not different amounts of gold nanoparticles, to HT-29 (human colorectal adenocarcinoma cells) and VERO cells. The authors reported 67% of viability of HT-29 cells exposed to chitosan-pectin hydrogels. Gold nanoparticles augmented the cytocompatibility of the chitosan-pectin biomaterial, increasing cell viability to more than 90%. Cell viability results depended on of the studied cell types, and chitosan-pectin-gold nanoparticles composites were more biocompatible to HT-29 cells than to VERO cells.

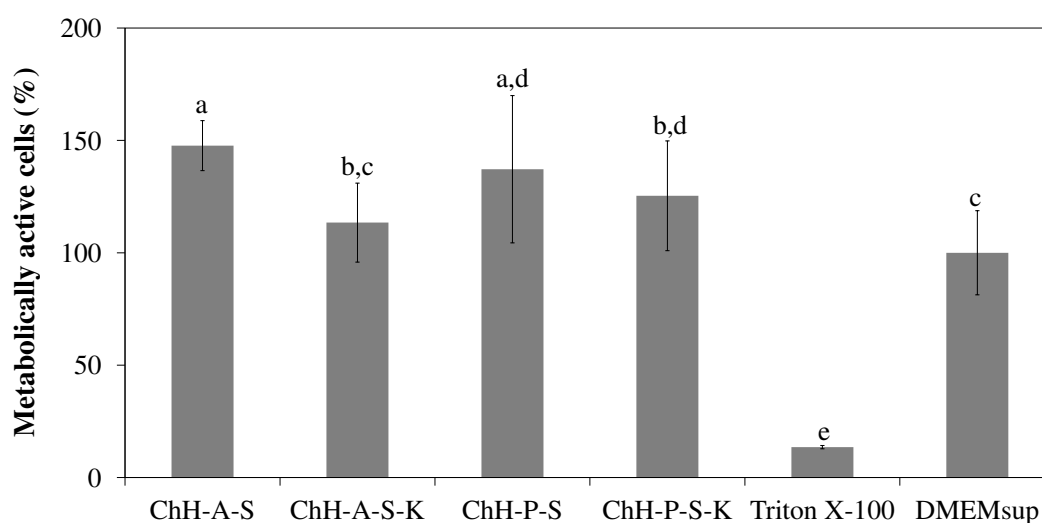


Figure 4: Indirect cytotoxicity to HDF (primary human dermal fibroblasts) cells of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of the additives Silpuran® 2130 A/B (S) and Kolliphor® P188 (K) with chitosan of high (ChH) molar weight. Cell cultures in standard supplemented culture medium (DMEMsup) were used as negative control and with 1% Triton X-100 in PBS as positive control of toxicity. The results were normalized to the viability of the negative control (untreated cells). Different letters indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

Additional cytocompatibility assays were performed to assess the response of the direct contact of human smooth muscle cells to Ch-A- and Ch-P-based formulations, confirming the potential of the materials as scaffolds for tissue engineering (data not shown).

3.2.5. Conclusions

This work shows that physico-chemical and mechanical properties of chitosan-based scaffolds are significantly affected by the use of different polyanions for complexation with chitosan. Moreover, the variation of chitosan molar weight has also a substantial impact on the mechanical properties of these scaffolds. The extents of interchain interaction and polymer network organization vary in the different formulations, as well as the degree of crosslinking, which showed to be higher in those prepared with pectin. Indeed, the use of pectin and high molar weight chitosan resulted in matrices with improved elastic moduli. Furthermore, scaffolds containing pectin present poroviscoelastic behavior, a mechanical characteristic important for the physiological function of many soft tissues. Thus, although chitosan-pectin polyelectrolyte complexes are not yet widely explored for tissue engineering applications, these materials present suitable properties and can be further explored for this purpose, contributing to broaden the range of applications of this class of materials in the medical field.

3.2.6. Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support to this research by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil – Grants #2013/26534-1 and #2017/01858-0), Coordination for the Improvement of Higher Educational Personnel (CAPES, Brazil – Finance code 001), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Emerging Leaders in America Program (ELAP, Canada) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Program).

3.3. POLYSACCHARIDE-BASED TISSUE-ENGINEERED VASCULAR PATCHES[§]

Fernanda Carla Bombaldi de Souza¹, Renata Francielle Bombaldi de Souza¹, Bernard Drouin²,
Ketul C. Popat³, Diego Mantovani² and Ângela Maria Moraes^{1*}

¹ Department of Engineering of Materials and of Bioprocesses, School of Chemical Engineering,
University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Canada Research Chair I in Biomaterials and
Bioengineering for the Innovation in Surgery, Department of Min-Met-Materials Engineering,
Research Center of CHU de Quebec, Division of Regenerative Medicine, Laval University,
Quebec, QC, Canada

³ Department of Mechanical Engineering, School of Biomedical Engineering, Colorado State
University (CSU), Fort Collins, CO, USA

*Correspondence to: Â. M. Moraes (E-mail: ammoraes@feq.unicamp.br)

3.3.1. Abstract

Coronary artery and peripheral vascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality worldwide and often require surgical intervention to replace damaged blood vessels, including the use of vascular patches in endarterectomy procedures. Tissue engineering approaches can be used to obtain biocompatible and biodegradable materials directed to this application. In this work, dense or porous scaffolds constituted of chitosan (Ch) complexed with alginate (A) or pectin (P) were fabricated and characterized considering their application as tissue-engineered vascular patches. Scaffolds fabricated with alginate presented higher culture medium uptake capacity (up to 17 g/g) than materials produced with pectin. A degradation study of the patches in the presence of lysozyme showed longer-term stability for Ch-P-based scaffolds. Pectin-containing matrices presented higher elastic modulus (~280 kPa) and ability to withstand larger deformations. Moreover, these materials demonstrated also better performance when tested

[§] Este artigo foi publicado com modificações na revista internacional indexada *Materials Science and Engineering C* e está sendo reproduzido com permissão da editora Elsevier / This paper was published with modifications in the *Materials Science and Engineering C* and is herein reprinted with permission from Elsevier. Ref.: Souza, F.C.B.; Souza, R.F.B.; Drouin, B.; Popat, K.C.; Mantovani, D.; Moraes, A.M. Polysaccharide-based tissue-engineered vascular patches. *Materials Science and Engineering C* 104 (2019) 109973.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109973>

for hemocompatibility, with lower levels of platelet adhesion and activation. Human smooth muscle cells (HSMC) adhered, spread and proliferated better on matrices produced with pectin, probably as a consequence of cell response to higher stiffness of this material. Thus, the outcomes of this study demonstrate that Ch-P-based scaffolds present superior characteristics for the application as vascular patches. Despite polysaccharides are yet underrated in this field, this work shows that biocompatible tridimensional structures based on these polymers present high potential to be applied for the reconstruction and regeneration of vascular tissues.

Keywords: chitosan, alginate, pectin, scaffold, patch, vascular tissue engineering

3.3.2. Introduction

Cardiovascular diseases, including coronary and peripheral artery diseases remain the leading cause of morbidity and mortality worldwide (WHO, 2018). Vascular surgical interventions are often necessary to repair or replace damaged blood vessels, to restore blood flow and preserve functions of downstream tissues (Hu *et al.*, 2012a).

Endarterectomy, a surgical procedure performed to correct the stenosis (narrowing) of carotid and peripheral arteries, involves a longitudinal opening in the artery for the removal of atherosclerotic plaques followed by primary closure or patch-assisted closure (Muto *et al.*, 2009). The use of vascular patches in endarterectomy procedures results in reduced risk of post-operative complications that lead to vessel reocclusion (Mannheim *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2009; Rerkasem and Rothwell, 2011).

Vascular patch materials include synthetic or autologous vein patches and xenogenic biological materials (Mannheim *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2009). The synthetic patches are usually made from expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), polyethylene terephthalate (PET) and Dacron (constituted of polyester fibers). All of these biomaterials show good mechanical properties and *in vivo* durability, besides being readily available and technically easy to use; however, they are highly susceptible to calcification and infection (Cho *et al.*, 2005; Mannheim *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2009). Autologous vein patches are normally harvested from the own patient's saphenous or jugular veins and, in contrast to synthetic materials, are resistant to infections, but their use is associated with morbidity of the donor site (Rerkasem and Rothwell, 2011). Among the biological patches, bovine pericardium is one of the preferred options as it

offers the benefits of off-the-shelf availability, durability and biocompatibility, but it presents a high risk of contamination with pathogens (Muto *et al.*, 2009).

Many recent advances in the development of vascular substitutes are consequences of tissue engineering approaches, focusing on the culture of vascular cells on biodegradable scaffolds (Wingate *et al.*, 2012). Tissue-engineered vascular patches have potential to overcome the problems associated to the use of other biomaterials, with the prospective of device customization according to the requirements of an individual patient (Cho *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2009).

The current tissue engineering approaches to obtain cardiovascular patches focus mainly on the use of decellularized tissue matrices (Cho *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2017; Lux *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2008; Wilshao *et al.*, 2006) and synthetic polymeric scaffolds (Shin'oka *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Stock *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2017). Fewer works report the use of nature-derived polymers for this purpose (Aguiar *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2013; Malm *et al.*, 2009).

Naturally occurring polymers, such as polysaccharides, are extensively used in tissue engineering applications due to their biodegradability, biocompatibility and ability to mimic the native extracellular matrix (Dhandayuthapani *et al.*, 2011; Keane and Badylak, 2014). Polysaccharides such as chitosan, alginate, pectin and xanthan gum can be efficiently combined by electrostatic interaction, resulting in matrices that can be further mechanically and chemically strengthened by the addition of calcium ions (Croisier and Jérôme, 2013; Berger *et al.*, 2004). Porous matrices of these same polysaccharides can be obtained by casting the polymeric mixtures in the presence of biocompatible surfactants (Bueno and Moraes, 2011; Section 3.2).

The potential of matrices produced by the combination of chitosan-alginate and chitosan-pectin for the use as scaffolds in tissue engineering has already been demonstrated (Bierhalz *et al.*, 2016; Furuya *et al.*, 2017; Neufurth *et al.*, 2015; Wilkens *et al.*, 2016; Coimbra *et al.*, 2011; Archana *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2018b). More recently, the effect of both chitosan molar weight and polyanion type on the properties of these materials was assessed, showing that varying extents of interchain interaction, degree of crosslinking and polymer network organization result in matrices with different physicochemical and mechanical properties (Section 3.2). Since the use of high molar weight chitosan originates matrices with superior mechanical resistance (Bierhalz *et al.*, 2016; Section 3.2), this chitosan was selected to

be further explored herein for the fabrication of chitosan-alginate and chitosan-pectin scaffolds for the particular application in the engineering of vascular tissues. Therefore, this work aimed at the development of chitosan-based dense and porous tissue-engineered structures able to function as patches for potential use in the yet little explored field of reconstruction of vascular tissues using polysaccharide-based biomaterials. To validate the suitability of these materials to be used for the proposed application, their physico-chemical and mechanical characterization was performed and fundamental aspects related to their hemo- and cytocompatibility were analyzed, such as thrombogenicity, platelet adhesion and activation and smooth muscle cells adhesion and proliferation.

3.3.3. *Materials and Methods*

3.3.3.1. *Materials*

Chitosan-based scaffolds were prepared using chitosan (Ch) of high molar weight (code 419419, lot number MKBP1333V) with deacetylation degree (DD) of 76 % and viscosity-average molar weight (M_v) of 1002 kDa; medium viscosity sodium alginate (A) from brown algae (code A2033, lot number 058K0126) with viscosity of 2900 cps (at 2% and 25 °C), ratio of mannuronate to guluronate groups (M/G) of 1.56 and M_v of 94.35 kDa; pectin (P) from citrus peel (code P9135, lot number SLBN9007V) with galacturonic acid content of 80.2 %, methoxylation degree of 7.6 % and M_v of 46.18 kDa; and the surfactant Kolliphor® P188 (K), all obtained from Sigma-Aldrich. Glacial acetic acid (Synth) and calcium chloride dihydrate (Merck) were also used. The water used was purified in a Milli-Q® system (Millipore). All other reagents used were of analytical grade.

3.3.3.2. *Scaffolds preparation*

Chitosan-alginate and chitosan-pectin scaffolds were prepared according to a previously described procedure (Section 3.2). Briefly, the polyelectrolyte complexes were obtained by mixing a chitosan solution at concentration 1 % w/v (in aqueous acetic acid solution, 1 % v/v) with an alginate aqueous solution at 0.5 % w/v or a pectin aqueous solution at 2 % w/v (Ch:A and Ch:P mass ratio of 1:1). Kolliphor® P188 was added at the proportion of 10 % w/w (in relation to the mass of polysaccharides) for obtaining porous scaffolds. Primary crosslinking of alginate or pectin was performed by addition of a 2% w/v CaCl_2 aqueous solution and a 2 M

NaOH aqueous solution was added to neutralize the pH of the polymeric mixture. The mixture was transferred to four polystyrene Petri dishes of 15 cm diameter and solvent casting was performed for 24 or 36 h at 37 °C, for dense or porous formulations, respectively. Scaffolds were then immersed in 2% w/v CaCl₂ solution for secondary crosslinking and finally washed with water and 10 mM HEPES buffer. Final drying was performed for 24 hours at room temperature. For the biological testing, the scaffolds were disinfected by exposure to ethanol solution (70 % v/v) overnight and samples from at least two different production batches were used.

3.3.3.3. *Scaffolds characterization*

3.3.3.3.1. *Aspect and morphology*

The visual aspect of dry samples or samples immersed in deionized water for 1 hour was assessed with a photographic camera. The cross-section and surface morphology of scaffolds samples previously metalized with gold were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) (LEO 440i, Leica). The software Image J was used to analyze SEM images of porous scaffolds and measure the average pore size.

3.3.3.3.2. *Uptake capacity and mass loss in culture medium*

Liquid uptake capacity and mass loss of the scaffolds after 7 days in culture medium were analyzed by gravimetry, according to procedures previously described (Souza *et al.*, 2017). The culture medium used was DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin solution (Pen-Strep, Gibco) (hereafter referred to as DMEMsup). The study was performed with sterile samples of 15 mm diameter immersed in 3 mL of culture medium in a 12-well plate, in triplicate. Scaffold thickness after immersion in DMEMsup was measured using a dial thickness gage (Mitutoyo). Measurements were taken at ten different positions of the film and the mean value was calculated.

3.3.3.3.3. *Degradation with lysozyme*

Degradation studies in the presence of lysozyme were performed based on the protocol described by Freier *et al.* (2005). The assay was performed with samples of 1 cm x 1 cm with known dry weights in 1.5 mL of lysozyme (chicken egg white, L3790, Sigma-Aldrich)

solution in phosphate-buffered saline (PBS) at 1.5 µg/mL. This concentration of lysozyme was chosen to correspond to its concentration in human serum. Briefly, sterile samples were incubated in the lysozyme solution at simulated physiological conditions (pH 7.4, 37 °C) and 100 rpm. After 5, 10 and 25 days, the samples were removed from the medium, rinsed with distilled water, dried and weighed. Solutions were changed at days 5 and 10. Biodegradation was calculated as the percentage of weight loss of the dried films after lysozyme treatment. Separation between enzymatic degradation and dissolution in PBS was assessed by incubating control samples in the buffer without lysozyme throughout the same period. The assay was performed in triplicate for each condition.

3.3.3.3.4. *Mechanical properties*

Tensile stress relaxation tests were performed using an ElectroPuls E1000 tester (Instron Corporation). Samples (n=3) with dimensions 2 cm x 1 cm were swollen in PBS and placed on the equipments grips in a PBS bath at room temperature. The initial distance between grips was adjusted to 10 mm (0% strain value). Samples were submitted to stretching cycles of 5% strain at a speed of 0.05 mm/s. The relaxation time was set to 1000 s (under constant strain) to take into account the viscoelastic behaviour of the material and obtain a steady value for the residual load. A total of 8 ramps of deformation were applied to the material, totalizing 40% (nominal) strain. Induced force was recorded as a function of time by using a 5 N load cell (Instron Corporation) and the stress (nominal) was calculated by taking into account the sample (nominal) cross section and the residual load. The elastic modulus of the scaffolds was calculated as the slope of the stress-strain curves.

3.3.3.3.5. *Platelet adhesion and activation*

The analysis of platelet adhesion and activation on the surface of the scaffolds and the evaluation of toxicity of the materials towards platelets were performed according to the procedures described by Simon-Walker *et al.* (2017). The protocol for blood isolation from healthy individuals was approved by the Colorado State University Institutional Review Board. Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation of whole human blood at 150g for 10 min to remove red blood cells. The plasma was allowed to rest for 10 min prior to use and then pooled into a sterilized conical tube. For both cell adhesion and cytotoxicity assays, sterile samples of 8

mm diameter (n=3) were placed into a 48-well plate and incubated with 400 μ L of pooled plasma on a horizontal shaker plate (100 rpm) for 2 h at 37°C and 5% CO₂. Both the samples and the plasma contacting the patch specimens were analyzed, the first regarding platelet adhesion and activation by scanning electron microscopy, and the second concerning the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released by the platelets as a result of lysis associated with activation during blood clot formation (Simon-Walker *et al.*, 2017).

For platelet adhesion and activation analysis, after incubation in plasma, the substrates were fixed with a primary fixative solution constituted of 0.1 mol/L sucrose, 0.1 mol/L sodium cacodylate and 25% glutaraldehyde solution for 45min. The scaffolds were then incubated for 10 min in a buffer solution (0.1 mol/L sodium cacodylate and 0.1 mol/L sucrose in deionized water). After that, samples were dehydrated by exposure to ethanolic solutions of increasing concentrations (35, 50, 70 and 100% v/v), for 10 min each. Then, the samples were incubated in hexamethyldisilazane (HMDS) for 10 min. The materials were finally dried at room temperature and stored in a desiccator. Before analysis by SEM, scaffold surfaces were sputtered with a thin layer of gold.

To evaluate the effects of the patches to platelets, after the 2 h incubation period, 100 μ L of sample-exposed plasma were collected from each well (n=6) and the LDH concentration in these aliquots was assayed using a commercial kit (item 601170, Cayman Chemical), based on the analysis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) reduction in the presence of lactate by LDH at 490 nm, according to the manufacturer's protocol, using a plate reader (BMG LabTechFluostar Omega). Sample-exposed plasma was compared to pooled plasma containing platelets placed in a polystyrene plate (nontoxic control surface) and also plasma treated with 10 % (v/v) Triton X-100® in deionized water (maximum release of LDH, correspondent to toxic control).

3.3.3.3.6. *Thrombogenicity*

The free hemoglobin method was used to evaluate the formation of thrombi when complete human blood is in contact with the surface of the scaffolds, based on the procedure described by Montaña-Machado *et al.* (2015). At first, CaCl₂ (1.29 % w/v) was added to citrated blood (20 % v/v) to start coagulation. Immediately after the addition of CaCl₂, 50 μ L of blood were added to the surface of disk-shaped patch samples of 14 mm diameter placed in 24-well

plates. The surface of cell culture polystyrene plates were used as positive control for thrombus formation, while Teflon[®] was used as negative control. The samples were then incubated at 37 °C for 60 minutes. After that, 2 mL of distilled water were added to each surface, leading to hemolysis of red blood cells not entrapped in a thrombus. Then, the absorbance of hemoglobin molecules released in water was monitored at 540 nm using a spectrophotometer (μQuantTM, BioTek Instruments Inc.). Three independent experiments were performed with blood from different donors and each assay was performed in quadruplicate.

3.3.3.3.7. *Cell culture and cytocompatibility assays*

Primary human umbilical artery smooth muscle cells (HSMC) were purchased from Lonza (CC-2579) and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere under constant supply of 5% CO₂ in DMEMsup. Passages between 7 and 12 were used for all the experiments. Two independent experiments were conducted for each type of assay.

The *in vitro* indirect cytotoxicity of the scaffolds to HSMC was assessed by exposing cells to extracts of the materials and subsequently determining cell viability with resazurin sodium salt, according to the procedure previously described (Section 3.2). In the present section, the indirect cytotoxicity was evaluated with samples extracts obtained at three different timepoints (1, 3 and 7 days).

The adhesion, proliferation and viability of HSMC seeded on the chitosan-alginate and chitosan-pectin dense and porous flat scaffolds were also assessed. Sterile scaffolds samples (8 mm in diameter) were individually arranged in 48-well flat-bottom plates. To avoid samples from floating during the study, sterile polystyrene hollow tubes (6.4 mm of internal diameter and 8 mm of length) were placed on top of the samples in the wells. Prior to cell culture, samples were washed with PBS and incubated with 400 μL of DMEMsup at 37 °C and 5 % CO₂ overnight to swell. Afterwards, the excess of culture medium was removed and 400 μL of a suspension of HSMC in DMEMsup at a concentration of 2.5×10^4 cells/mL was inoculated on the surface of each sample (1.0×10^4 cells/well). The samples were maintained in the incubator at 37 °C and 5 % CO₂ for up to 7 days, and the culture medium every 48 h. As a control, the adhesion of cells to polystyrene 48-well plate without the scaffolds was also monitored. Cells metabolic activity, adhesion and proliferation were assessed by the resazurin assay and immunofluorescence staining.

The resazurin assay was used for evaluating cell viability in terms of metabolic activity, based on the procedure previously described (Section 3.2). After 1, 3 and 7 days of HSMC culture on the scaffolds (n=5), the culture medium was replaced with fresh medium containing the resazurin sodium salt diluted in DMEMsup. After 6 h of incubation (37 °C, 5% CO₂), 100 µL aliquots of each well were collected, transferred to a 96-well and the fluorescence was determined. Resazurin in its non-reduced and reduced form (resorufin, obtained by autoclaving of the resazurin solution in DMEMsup for 15 min) was also incubated with the samples and used as controls to determine whether the scaffolds adsorbed the testing reagent, which could affect the measured fluorescence. The results are expressed as metabolic activity in terms of relative fluorescence units (RFU).

For immunofluorescence analyses after 7 days of HSMC culture, the patches specimens (n=3) were rinsed with PBS, fixed in 3.7 % formaldehyde (Sigma) for 1 hour and again washed with PBS. Samples were then exposed to PBS supplemented with 3% BSA for 20 min. The F-actin and nuclei were stained using rhodamine-conjugated phalloidin (1:200, Sigma) and DAPI (1:3000, Thermo Fischer Scientific), respectively, in a solution of PBS containing 3% BSA (Sigma) and 0.1% Saponin (Sigma) for 90 min in the dark. As a final step, the material was washed with 0.05% Tween 20[®] (Sigma) in PBS. Samples were kept in PBS until image acquisition was performed by using an Olympus BX51 fluorescence microscope.

3.3.3.4. *Statistical analysis*

The results obtained were analyzed using the Tukey test to determine statistically significant differences among averages at 95% confidence limits with the Software Statistica 7.0.

3.3.4. *Results and discussion*

3.3.4.1. *Physical, physicochemical and mechanical properties*

The visual aspect of scaffolds before and after immersion in deionized water is shown in Figure 1. As expected, the addition of Kolliphor[®] P188 to the polymeric mixtures substantially changed the aspect of the materials in comparison to formulations without the surfactant, originating porous matrices with spongy and opaque appearance (Figure 1, Ch-A-K and Ch-P-K formulations).

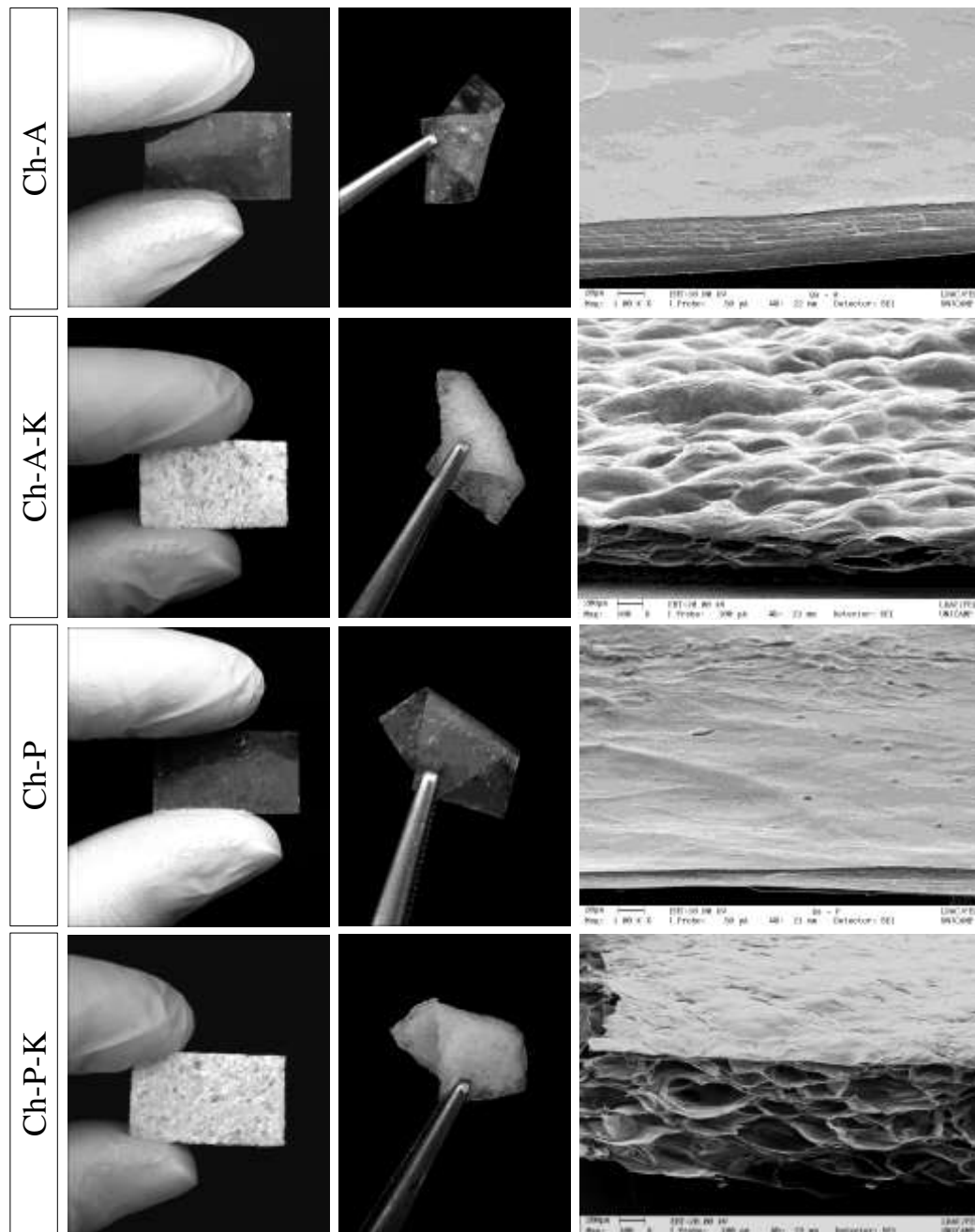


Figure 1: Typical visual aspect of dry scaffolds (first column) or scaffolds after immersion in deionized water for 1 hour (second column), and micrographs of surface and cross section (third column) of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of Kolliphor® P188 (K).

All formulations become more flexible after swelling in water, what facilitates handling of the material and setting in different conformations. The typical morphology of the

scaffolds in micrometric scale, also presented in Figure 1, is equivalent to that shown in previous works (Section 3.2; Bueno *et al.*, 2014). The cross-section micrographs revealed a dense and lamellar structure for Ch-A and Ch-P and the presence of homogeneously distributed pores for Ch-A-K and Ch-P-K. The presence of pores in the formulations produced with K results from foam formation when mixing polymeric solutions during scaffold fabrication and its stabilization during solvent casting, as described by Bueno *et al.* (2014). Higher porosity was observed for Ch-P-K and rougher surfaces were obtained when K was added to the formulations, as well as for dense Ch-P formulation in comparison to Ch-A, as previously reported (Section 3.2).

Cho *et al.* (2005) obtained tissue-engineered vascular patches using autologous bone marrow-derived cells and decellularized canine tissue matrices. Scanning electron micrographs of the cross-section of decellularized tissue matrices indicated porous and multi-layer structures, closely resembling the structures of Ch-A-K and Ch-P-K obtained in the present work.

Thickness of the scaffolds after exposure to DMEM, as well as their uptake capacity and mass loss after 7 days in culture medium are shown in Table 1. The assessment of culture medium uptake capacity is important because it indicates if matrix swelling during cell culture would be adequate to promote effective transport of nutrients essential for cell growth and proliferation. Besides, the study of mass loss of the materials when incubated in culture medium may evidence their stability in cell culture conditions and even allow conjecturing regarding their behavior *in vivo*.

Table 1: Thickness, liquid uptake capacity and mass loss of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of Kolliphor® P188 (K) exposed to DMEM culture medium for 7 days.

Formulation	Thickness (μm)	Uptake capacity (g/g)	Mass loss (%)
Ch-A	1154.3 $\pm$ 24.4 ^a	14.59 $\pm$ 1.34 ^a	15.72 $\pm$ 0.92 ^a
Ch-A-K	1720.0 $\pm$ 88.0 ^b	16.99 $\pm$ 0.49 ^b	25.69 $\pm$ 0.71 ^b
Ch-P	380.0 $\pm$ 58.4 ^c	5.55 $\pm$ 0.23 ^c	7.95 $\pm$ 0.79 ^c
Ch-P-K	1948.0 $\pm$ 25.7 ^d	16.42 $\pm$ 0.91 ^{a,b}	31.69 $\pm$ 1.69 ^d

Different letters in the same column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

The comparison of the behavior of dense formulations in DMEM indicates that Ch-A exhibit uptake capacity of culture medium about 2.6 times higher than Ch-P. As a consequence of the greater amount of liquid in the structure, mass loss presented by Ch-A is also higher, since

mass transfer is facilitated in this condition. In turn, porous formulations (Ch-A-K and Ch-P-K) present similar DMEM uptake capacity, although higher porosity was observed for P-containing material. The higher uptake capacity demonstrated by porous formulations reflects also on their higher mass loss, ranging from approximately 26 to 32%, but can still be considered as acceptable. As shown in a previous work (Section 3.2), the behavior in supplemented DMEM of chitosan-alginate and chitosan-pectin composites produced with silicone rubber (Silpuran[®] 2130 A/B) in the presence or absence of the surfactant Kolliphor[®] P188 is similar to that observed for the same materials without silicone described herein. According to reported in previous work (Section 3.2), higher degree of reticulation probably occurs in chitosan-pectin matrices, as well as different arrangement of polymer networks in these complexes due to distinct polymer chain conformations. Therefore, it is possible that Ch-P presents a more compacted structure than Ch-A, which hampers liquid penetration into the matrix.

Bierhalz *et al.* (2016) studied the uptake capacity and mass loss in supplemented α -MEM culture medium of dense and porous chitosan-alginate scaffolds produced in conditions similar to those employed in this work, but using chitosan of different origins (fungal or animal, with different molar weights). The authors reported decreasing uptake capacity with increasing molar mass of chitosan and attributed this behavior to the increased degree of cohesiveness of matrices produced with high molar weight chitosan. Therefore, the formulations produced with chitosan from animal source (high molar weight) presented the lowest uptake capacity, equal to 8.4 and 15.5 g/g and correspondent mass loss of 25.8 and 23.6 %, for dense and porous formulations, respectively, which are comparable to the results obtained in the present study.

After immersion in supplemented DMEM culture medium, thickness increased about 20.7 and 7.5 times for dense and porous formulations obtained with alginate and 2.8 and 3.2 times for dense and porous formulations with pectin, in comparison to the thickness of dry materials (data reported in Section 3.2), which reflects the higher DMEM uptake capacity presented by matrices containing alginate.

Ideally, a functional tissue engineered scaffold should present a controllable biodegradation rate that matches tissue regeneration (Thottappillil and Nair, 2015). Premature degradation can cause the collapse of the new tissue structure, since it might not yet have reached the suitable mechanical properties of mature tissues when fast degradation is observed. On the other hand, a long degradation time can delay or even interrupt the formation of the new tissue

(Pavia *et al.*, 2012).

The degradation of chitosan-based scaffolds was indirectly assessed by exposure to the presence of lysozyme solution and the results, in terms of mass loss, are shown in Table 2. Lysozyme is the main enzyme responsible for *in vivo* degradation of chitosan, acting on its acetylated units (N-acetyl glucosamine). Thus, the degrading activity of lysozyme decreases with increasing degree of deacetylation of chitosan (Guarino *et al.*, 2015).

Table 2: Lysozyme degradation of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of Kolliphor® P188 (K) represented in terms of mass loss after 5, 10 and 25 days of exposure to enzyme solution. Mass loss in PBS is also shown as control for sample intrinsic dissolution.

Formulation	Mass loss in PBS (%)			Mass loss in lysozyme (%)		
	5 days	10 days	25 days	5 days	10 days	25 days
Ch-A	13.3 ± 1.4 ^{a,A}	32.7 ± 6.4 ^{a,B}	39.7 ± 3.0 ^{a,b,B,C}	20.2 ± 3.0 ^{a,A}	35.2 ± 3.7 ^{a,b,B}	48.9 ± 1.6 ^{a,C}
Ch-A-K	33.4 ± 0.9 ^{b,A}	33.7 ± 8.6 ^{a,A,B}	45.3 ± 3.5 ^{a,B}	44.0 ± 6.9 ^{b,B}	44.7 ± 3.7 ^{a,B}	47.9 ± 5.6 ^{a,B}
Ch-P	16.4 ± 6.8 ^{a,A}	27.2 ± 6.5 ^{a,A}	30.0 ± 2.4 ^{c,A}	22.2 ± 7.2 ^{a,A}	25.4 ± 6.4 ^{b,A}	25.9 ± 5.8 ^{b,A}
Ch-P-K	19.3 ± 0.5 ^{a,A}	21.6 ± 0.7 ^{a,A,B}	31.5 ± 6.9 ^{b,c,B,C}	25.6 ± 2.1 ^{a,A,B,C}	24.4 ± 1.9 ^{b,A,B,C}	33.0 ± 4.3 ^{b,C}

Different letters in the same column or row indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). Lowercase letters refer to the comparison of data in the same column and capital letters refer to comparison of data in the same row.

According to Table 2, the mass loss of scaffolds exposed to lysozyme solution is not significantly different from mass loss of materials exposed to PBS solution without the enzyme. It means that the degradation of the scaffolds due to the action of lysozyme is negligible within the period of this study. As mentioned above, the slow degradation rate observed can be related to the high degree of deacetylation of the chitosan used in this work (76 %). In general, formulations containing alginate showed higher mass loss than formulations containing pectin, exceeding 45% in 25 days, which indicates longer-term stability of Ch-P and Ch-P-K scaffolds.

The mechanical behavior of the chitosan-based patches was assessed by tensile stress relaxation tests. Stress relaxation is a characteristic behavior of viscoelastic materials and corresponds to the time-dependent decay in stress under constant strain (Lee, 2006). Cardiovascular tissues in general exhibit viscoelasticity (Bouten *et al.*, 2011) and, ideally, a biomaterial used as vascular substitute should match this behavior, as it may significantly impact

the phenotypic and proliferative properties of vascular cells adhered to its surface and involved in the healing response of the tissue (Ucuzian and Greisler, 2011).

The stress-strain curves obtained for dense and porous formulations are shown in Figure 3. The tensile elastic modulus, given by the slope of the curves, was calculated as 10.2 ± 2.7 kPa for Ch-A, 3.4 ± 0.3 kPa for Ch-A-K, 279.1 ± 65.8 kPa for Ch-P and 52.8 ± 4.7 kPa for Ch-P-K. These values indicate that both formulations prepared with pectin present improved mechanical resistance in comparison to alginate-containing formulations. Besides, the formulations prepared with alginate ruptured before reaching the maximum strain setpoint, being the strain values attained for pectin-containing formulations higher (up to 40%) than for alginate-containing formulations (maximum of 20%). Considering that circumferential wall strains in human coronary arteries range between 10 and 15%, whereas longitudinal strains are higher because of the large deformations of the pumping heart (Bouten *et al.*, 2011), the formulations prepared with pectin would be more appropriate for the application as vascular patches, taking into account the larger longitudinal deformation they can withstand.

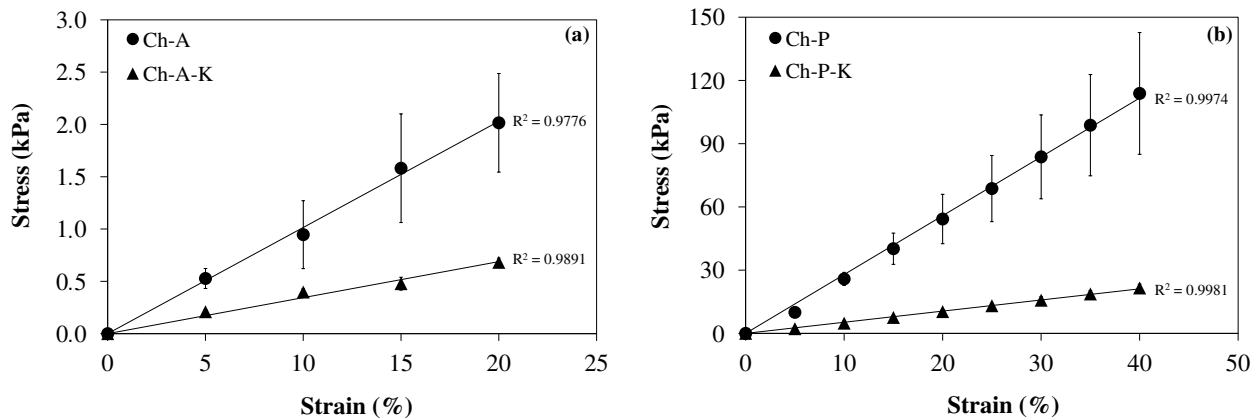


Figure 3: Stress-strain curves for chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of Kolliphor[®] P188 (K), submitted to tensile loads. Experimental data are shown with markers for dense (●) and porous (▲) formulations, and the solid lines represent the linear fit with the corresponding R^2 .

In accordance to the results reported herein, it was demonstrated in a previous work (Section 3.2) that Ch-P-based scaffolds present also higher compressive elastic modulus, which was attributed to possible higher degree of reticulation in chitosan-pectin matrices. Moreover,

these biomaterials present poroviscoelasticity, a mechanical feature characteristic of soft tissues, including vascular tissues, and related to the conformational rearrangements of the polymer network and the movement of interstitial fluid within the matrix.

3.3.4.2. *Blood contact response*

Considering the intended application of the scaffolds herein studied as blood contacting biomaterials, it is important to investigate their blood compatibility. The blood compatibility (or hemocompatibility) has been defined in different ways due to the complexity of blood-materials interactions, which depend on blood characteristics and coagulation biochemistry, as well as on intrinsic material properties. A hemocompatible material should then not show thrombogenic nor hemolytic properties, maintaining coagulation and inflammation processes under control at its interface with blood (Balan and Verestiuc, 2014).

Hemocompatibility can be assessed through the analysis of isolated events of the coagulation cascade, as well as by performing tests with complete blood, which could provide a better understanding of the interaction of the material with the biological fluid (Montaño-Machado *et al.*, 2015). As platelets are involved in the coagulation cascade, their adhesion, aggregation and activation on scaffolds surfaces were first evaluated, as well as the cytotoxicity of the materials towards these cells. Then, clot formation when complete blood was in contact with the surfaces was assessed. Figures 2 to 4 show the results of the blood-contact analysis.

Scanning electron micrographs of scaffolds surfaces after contact with platelets allow the qualitative evaluation of cell adhesion, activation and aggregation (Figure 2). Platelet shape changes according to their activation stage. Briefly, there are five states of morphological change upon adhesion on a surface, corresponding to four stages of activation: 1) round (unactivated) – smooth discoid and absence of pseudopodia; 2) dendritic (partially activated) – early unflattened pseudopodial; 3) spread-dendritic (moderately activated) – long dendritic extensions with some spreading and some pseudopodial flattening; 4) spreading (fully activated) – late pseudopodial, almost fully flattened and with some hyaloplasm spreading; 5) fully spread (fully activated) – full hyaloplasm spreading, no distinct pseudopodia (Ko and Cooper, 1993; Simon-Walker *et al.*, 2017).

Based on these criteria, it is possible to detect by the analysis of Figure 2 different platelet morphologies and corresponding activation stages resulting from the contact of blood with the developed biomaterials.

Figure 2: Representative scanning electron micrographs of the platelet adhesion and activation study for chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or not of Kolliphor® P188 (K). Polystyrene (PS) plate was used as control.

Polystyrene control exhibits several spreading and some fully spread platelets that can even form a film coating on some regions of the surface, meaning that they are fully activated. Ch-A presents mostly spread-dendritic and some spreading platelets, with very few fully spread cells, which also indicates a fully activated stage. Ch-A-K exhibits moderately activated platelets, with spread-dendritic and dendritic cells and significant aggregation. In turn, formulations containing pectin present overall less cells adhered and less aggregation. Ch-P has both dendritic and round-shaped platelets, suggesting a partially activated stage. Ch-P-K exhibit very few adherent cells, mostly round-shaped, and also very limited aggregation is observed, indicating an unactivated stage.

In short, formulations produced in the presence of Kolliphor® P188 exhibit less platelet adhesion and activation than the respective dense formulations. Moreover, scaffolds produced using pectin present overall less platelet adhesion and activation than PS control and correspondent formulations containing alginate. Results shown in Figure 3 corroborate these observations, since the percentage of area coverage of platelets adhering to the surface of Ch-P-K is significantly lower than to the surfaces of other materials. Considering the application as an implantable biomaterial, less platelet adhesion and activation on the surface of the material is attractive, meaning that it has lower potential to cause a thrombogenic effect when implanted.

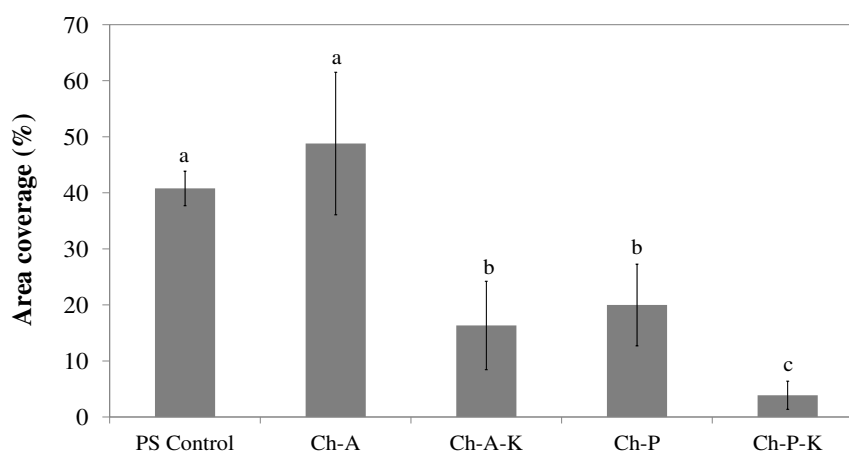


Figure 3: Percentage of area coverage of platelets adhering to the surface of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or not of Kolliphor® P188 (K). Polystyrene (PS) plate was used as control.

The adhesion and activation of platelets on a biomaterial is governed by a complex series of events and depends on the nature of the material, the structure, as well as the topology, hydrophilicity and charge of the surface (van Oeveren, 2013; Aussel *et al.*, 2017). The influence of biomaterial roughness on thrombus formation is not clear, since various studies show conflicting results, suggesting that rougher surfaces may either favor or inhibit platelet adhesion or even promote more activation of the clotting cascade in certain conditions (van Oeveren, 2013). In the present study, platelet adhesion seems to occur preferentially in rougher regions of scaffolds surfaces rather than on smoother regions. However, despite of the greater roughness of porous formulations, as reported previously (Section 3.2), overall less cell adhesion could be noticed on these surfaces, which means that surface topology does not play the major role on the behavior observed herein.

Surface hydrophilicity influences protein adsorption during the initial response of the material to blood contact. The amount and conformation of a particular adsorbed protein significantly affect hemocompatibility, since the adhesion of platelets to the surface is mediated by adherent proteins (Sperling *et al.*, 2009; van Oeveren, 2013). As previously reported (Section 3.2), the water contact angles of the chitosan-alginate and chitosan-pectin based scaffolds ranged from *c.a.* 41° to 98°. The surfaces of the scaffolds were all considered moderately hydrophilic and, for this reason, it is possible that surface hydrophilicity did not lead to the different platelet adhesion behavior observed in the distinct surfaces.

The mechanism of blood-chitosan interaction and induced thrombogenic response has been explained by the presence of positive charges in the polymer chain, related to the presence of amino groups in chitosan deacetylated units (Balan and Verestiuc, 2014). The positive charge can induce fibrinogen adsorption, followed by its conformational modification and platelet adhesion. Besides, interactions of free amino groups of chitosan with acidic groups of blood cells can induce hemagglutination and clot formation (Rao and Sharma, 1997; Balan and Verestiuc, 2014). In this work, however, chitosan is combined with alginate or pectin through ionic interactions formed chitosan amino groups and the carboxyl groups of the other polysaccharides. Since the pectin to chitosan molar ratio used herein is twice that of alginate to chitosan, the number of interactions of amino groups of chitosan with carboxyl groups of pectin is probably bigger (Section 3.2). Thus, less free amino groups would be available for Ch-P and Ch-P-K formulations to interact with proteins and blood cells. Therefore, surface charge of the scaffolds

probably exerted the highest impact on blood-contact response.

The cytotoxicity of chitosan-alginate- and chitosan-pectin-based scaffolds after 2 h of platelet incubation over the materials surfaces was assessed using a commercially available lactate dehydrogenase (LDH) assay kit. LDH is an enzyme located in the cytoplasm of cells. When exposed to toxic surfaces, cell necrosis is induced and the resulting cell lysis leads to enzyme release (Simon-Walker *et al.*, 2017).

As shown in Figure 4, LDH released by cells in contact with the tested biomaterials was lower than the maximum LDH release obtained for the cytotoxic Triton X-100[®] control. All tested samples were also significantly less cytotoxic than the noncytotoxic polystyrene control. Therefore, it is possible to conclude that none of the experimental surfaces present significant short-term cytotoxic effects on platelets.

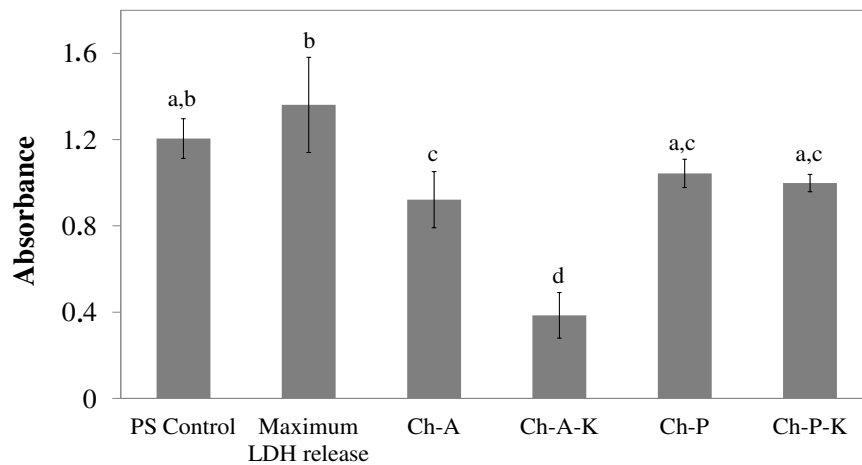


Figure 4: Absorbance correspondent to LDH release after platelet adhesion on chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or not of Kolliphor[®] P188 (K) (maximum release was obtained when platelets were exposed to Triton X-100[®] and control corresponds to platelet response to polystyrene, PS). Different letters indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

Thrombus formation when complete blood was in contact with the scaffolds surfaces was assessed by the free hemoglobin method and the results are shown in Figure 5. In this method, red blood cells not entrapped in a thrombus are hemolyzed by adding water to the samples and then free hemoglobin molecules are colorimetrically measured. Thus, higher amount

of free hemoglobin indicates less thrombi formation. All tested samples presented higher amount of free hemoglobin than the polystyrene plate, thrombogenic control, except for Ch-A, that presented statistically the same amount as the observed for this control. Moreover, lower amount of free hemoglobin was observed for Ch-A, Ch-A-K and Ch-P in comparison to the Teflon® control. The Ch-P-K formulation showed values of free hemoglobin comparable to that attained for Teflon®, which is herein considered as a material with satisfactory hemocompatibility for application as an implantable biomaterial. These results are in accordance with the results of platelet adhesion previously discussed, in which the Ch-A formulation showed a great number of adherent and fully activated cells, indicating activation of the coagulation cascade and clot formation, while Ch-P-K presented less platelet adhesion and activation.

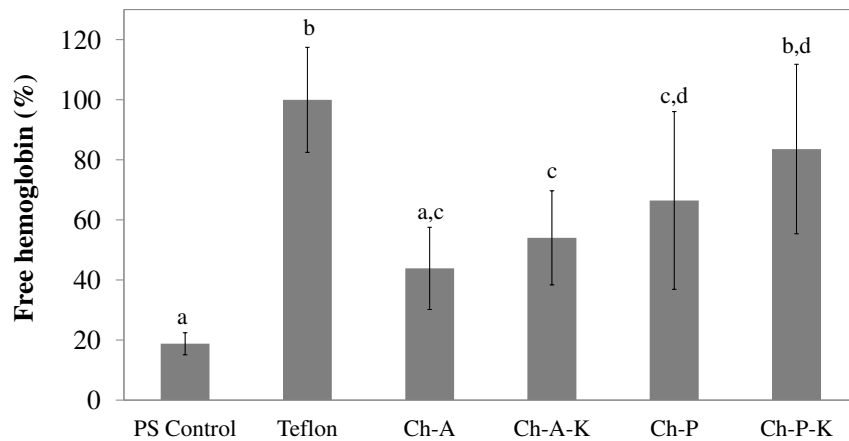


Figure 5: Thrombogenicity of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or not of Kolliphor® P188 (K), expressed as percentage of free hemoglobin (Teflon® and PS plate were used as controls). Different letters indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

3.3.4.3. *Cytocompatibility*

The indirect cytotoxicity of the scaffolds to human smooth muscle cells is shown in Figure 6 in terms of cell viability normalized to the control of untreated cells. The toxicity of biodegradable scaffolds is associated to the release of molecular or particulate degradation products that can have an influence on cell behavior. These components may be cytotoxic, with the capacity of killing cells, or altering cell functions such as proliferation, respiration and metabolism, or even affecting cell structure and morphology (Williams, 2008).

Considering that the mass loss of the scaffolds in DMEM can reach up to *c.a.* 30% in 7 days (for Ch-P-K, as shown previously), the cytotoxicity of scaffolds extracts obtained with 1, 3 or 7 days of exposure of the materials to the culture medium was tested, in order to assess the impact of soluble components or from degradation products released by the scaffolds during this time on cells.

The results show that the amount of metabolically active cells after exposure to the extracts of the scaffolds, for all formulations studied and all extract time points, was equal or superior to the control of untreated cells, which means that the compounds released from the biomaterials present no toxic effect to the cells. It is important to highlight that no bacterial contamination was observed when examining the scaffold samples and the wells seeded with HSMC by optical microscopy.

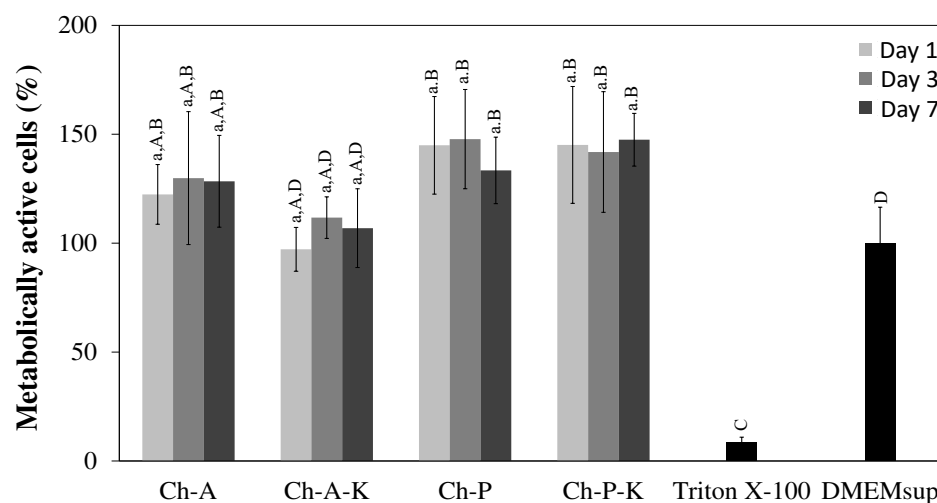


Figure 6: Indirect cytotoxicity of chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of Kolliphor® P188 (K) to human smooth muscle cells (HSMC). Extracts of the scaffolds obtained from exposure of the materials to DMEMsup during 1, 3 or 7 days were used in the test. Cell cultures with DMEMsup not previously in contact with the materials were used as negative control, while cells exposed to 1% Triton X-100 in PBS consisted of the positive control of toxicity. The results were normalized to the negative control (untreated cells). Different letters indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). Lowercase letters refer to the comparison of data for the same formulation in different time points and capital letters refer to comparison of data of different formulations for the same time point and the controls.

Adhesion, proliferation and metabolic activity of human smooth muscle cells seeded on the scaffolds were assessed and the results are shown in Figures 7 and 8. An increase in cells metabolic activity was observed from day 1 to day 3 and then to day 7 for cells growing on the polystyrene well, used as control. For alginate-containing formulations, no statistic difference was observed on the metabolic activity of HSMC on days 1 and 3, and a slight decrease was verified on day 7. Moreover, no difference on cell behavior was observed between porous and dense formulations. For pectin-containing formulations, also no significant difference was observed for cell metabolic activity on the first days of culture, however, an increase of the activity was verified on the last day of the study. The highest metabolic activity was observed for cells seeded on dense Ch-P scaffolds when compared to the other scaffold formulations.

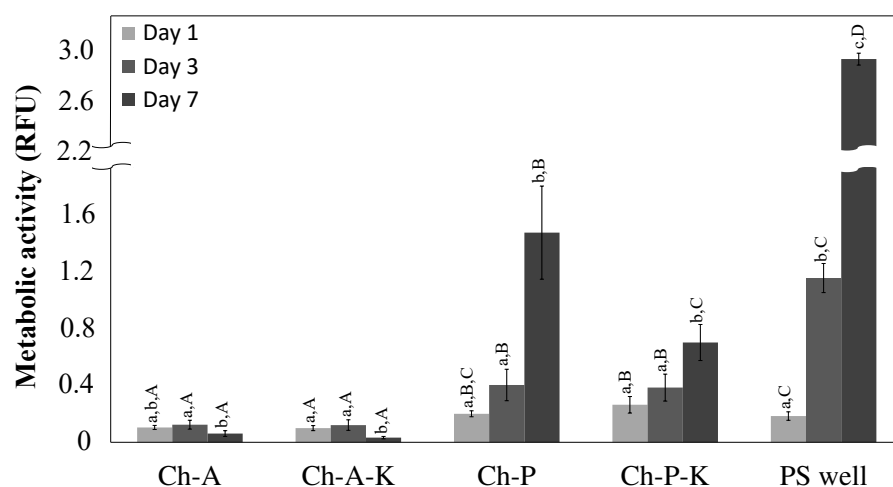


Figure 7: Metabolic activity of human smooth muscle cells seeded on chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of Kolliphor® P188 (K). The resazurin test was performed after 1, 3 and 7 days of culture on scaffolds and the results are shown in terms of relative fluorescence units. Cells growing on the polystyrene (PS) well were used as control. Different letters indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). Lowercase letters refer to the comparison of data for the same formulation in different time points and capital letters refer to comparison of data of different formulations for the same time point and the controls.

A number of factors are involved in the cytocompatibility of a biomaterial. Many are related to the chemistry and surface properties of the material and include the balance between the hydrophilicity and the hydrophobicity on the surface, the interfacial free energy, the type and

the density of surface charges, the surface topography and roughness, the chemical structure and functional groups, among others (Wang *et al.*, 2004). However, the mechanical properties of the material equally impact cells behavior and compatibility to the substrate (Schwarz and Bischofs, 2005).

It has been demonstrated that cells respond to the stiffness of their substrate, being able to adhere, spread, assemble their cytoskeleton and anchor more strongly to stiff substrates in comparison to soft substrates (Discher *et al.*, 2005; Discher *et al.*, 2009). Mechanosensing of substrate by cells exerts an effect on their adhesion and cytoskeleton organization, as well as on contractile forces. On soft gels, cells need to be less contractile than on stiff gels, therefore cell adhesion does not need to be as strong (Discher *et al.*, 2005). In accordance to these observations for many cell types, smooth muscle cells are also found to better spread and organize their cytoskeleton on stiff gels rather than on soft ones (Engler *et al.*, 2004).

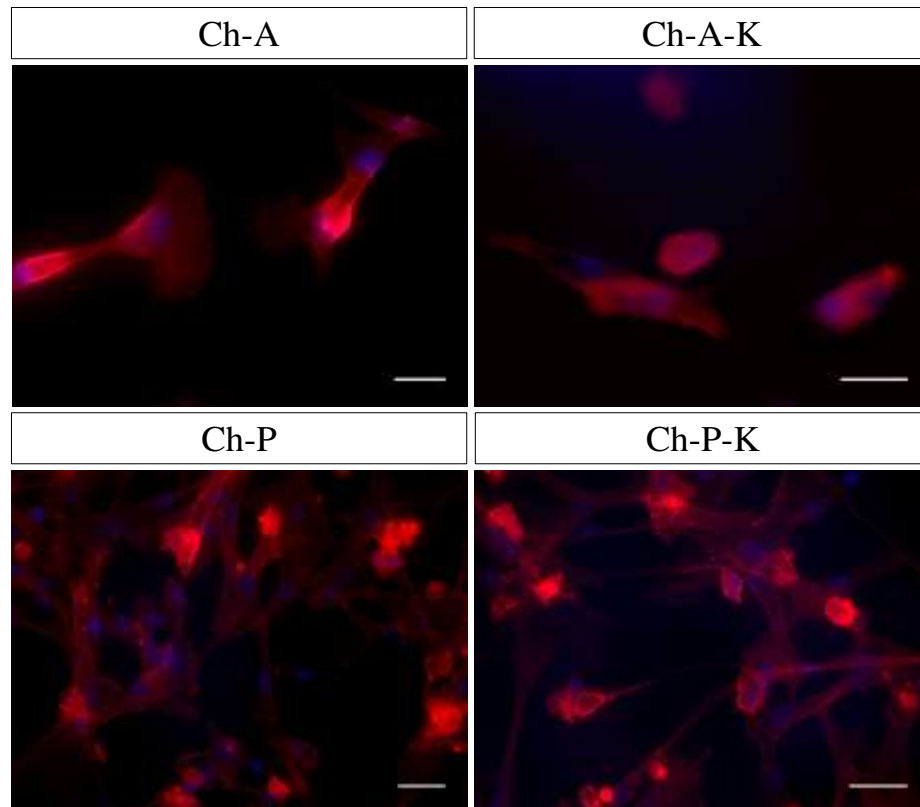


Figure 8: Representative images of immunofluorescence staining of nuclei (dapi, blue) and F-actin (rhodamine-conjugated phalloidin, red) of human smooth muscle cells seeded on chitosan-alginate (Ch-A) and chitosan-pectin (Ch-P) scaffolds produced in the presence or absence of Kolliphor® P188 (K) after 7 days of culture. Scale bars are 20 μm .

Indeed, the results of this study show that HSMC adhered, spread and proliferated better on matrices containing pectin, which are significantly stiffer than alginate-containing matrices, as previously discussed. As shown in Figure 8, Ch-P presents the highest amount of adhered cells, which are well distributed and spread throughout the scaffold surface, with notable polygonal and slightly dendritic appearance. Ch-P-K also presents a satisfactory amount of attached cells, mostly with well organized and spread cytoskeletons. Ch-A and Ch-A-K formulations, on the other hand, present appreciably lower amount of cells, which have a much less spread profile, with some round-shaped cells on Ch-A-K.

Martins *et al.* (2018b) produced chitosan-pectin scaffolds using two different proportions between the polysaccharides and assessed the adhesion and proliferation of adipose-derived stem cells seeded on the materials. The authors observed that the surface wettability and swelling properties of the matrices played an important role on promoting attachment of the stem cells. The most hydrophilic formulation having the highest swelling degree presented lower amount of attached cells, which the authors explained by the high diffusion rate of water molecules at the equilibrium state, capable of decreasing or even suppressing cell attachment. It is possible to correlate these observations to the behavior of cells on the matrices in the present work, as the swelling in culture medium for Ch-A is higher than for Ch-P scaffolds, and porous formulations uptake more medium than dense ones, as previously shown.

3.3.5. Conclusions

The suitability of chitosan-alginate and chitosan-pectin dense or porous scaffolds for tissue engineering applications had already been demonstrated in a previous work (Section 3.2). However, in the present study, fundamental aspects related to their hemocompatibility and cytocompatibility were reported, aiming at their application as blood-contacting materials, with intended use as patches for the reconstruction and regeneration of vascular tissues.

The study evidenced superior characteristics of Ch-P-based scaffolds for the desired application, such as improved stability in culture medium and longer-term stability upon degradation, as well as enhanced mechanical properties and blood-contact response in comparison to Ch-A-based scaffolds. Besides, HSMC adhered, spread and proliferated better on matrices containing pectin, which was mainly attributed to cell response to higher stiffness of this material. The results indicated that both alginate and pectin-based formulations could be further

investigated for blood-contact applications, due to their lack of cytotoxicity and mild thrombogenicity. Thus, despite the overall better performance of Ch-P-based matrices, all scaffolds herein studied might be considered promising candidates for the application as vascular patches. In the case of Ch-A-based matrices, surface modifications or further mechanical reinforcement might improve cellular response.

3.3.6. Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support to this research from São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil – Grants #2013/26534-1 and #2018/01858-0), Coordination for the Improvement of Higher Educational Personnel (CAPES, Brazil – Finance code 001), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Emerging Leaders in America Program (ELAP, Canada) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Program). We also thank Dimitria Camasão, Caroline Loy, Daniele Pezzoli and Francesco Copes (Université Laval, Canada) and Rachael Simon-Walker (Colorado State University, USA) for providing insight and expertise that greatly assisted this research.

3.4. A SIMPLE AND EFFECTIVE APPROACH TO PRODUCE TUBULAR POLYSSACHARIDE-BASED HYDROGEL SCAFFOLDS[§]

Fernanda Carla Bombaldi de Souza¹, Dimitria Bonizol Camasão², Renata Francielle Bombaldi de Souza¹, Bernard Drouin², Diego Mantovani² and Ângela Maria Moraes^{1*}

¹ Department of Engineering of Materials and of Bioprocesses, School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Canada Research Chair I in Biomaterials and Bioengineering for the Innovation in Surgery, Department of Min-Met-Materials Engineering, Research Center of CHU de Quebec, Division of Regenerative Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

The second and third authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Â. M. Moraes (E-mail: ammoraes@feq.unicamp.br)

3.4.1. Abstract

The production of porous tubular scaffolds is of great interest in the field of tissue engineering, given the existence of several tubular structures in the human body. In particular for vascular tissue engineering, there is a need for biocompatible constructs for replacing small caliber blood vessels, especially those below 6 mm in diameter. In this work, a new methodology was developed for the fabrication of tubular shaped scaffolds based on the casting of polymeric solutions by controlled crosslinking mediated by a semipermeable cast. The fabrication of hydrogel tubular scaffolds from chitosan-pectin polymeric mixtures was performed to attest the feasibility of the technique and the obtained materials were characterized considering their application in vascular tissue engineering. Tubular chitosan-pectin (tCh-P) devices with 4.15 ± 0.10 mm internal diameter and 1.55 ± 0.15 mm wall thickness were produced. The

§ Este artigo foi publicado com modificações na revista internacional indexada *Journal of Applied Polymer Science* e está sendo reproduzido com permissão da editora Wiley / This paper was published with modifications in the *Journal of Applied Polymer Science* and is herein reprinted with permission from Wiley. Ref.: Souza, F.C.B.; Camasão, D.B.; Souza, R.F.B.; Drouin, B.; Mantovani, D.; Moraes, A.M. A simple and effective approach to produce tubular polysaccharide-based hydrogel scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science* (2019) 48510.

<https://doi.org/10.1002/app.48510>

structures are highly porous ($97.8 \pm 0.5 \%$), presenting interconnected pores with average diameter equal to $359 \pm 199 \mu\text{m}$. Seeding of human smooth muscle cells on the material was successfully achieved by using collagen gel to facilitate cell migration and retention inside the structure of the scaffold. Masson's trichrome and fluorescence stainings confirmed that the collagen gel efficiently infiltrated the tCh-P matrix pores, enhancing the ability of cells to uniformly penetrate the scaffold. The mechanical property of the scaffold was affected by its high porosity and significant mass loss in culture medium ($32.2 \pm 8.2 \%$ in 7 days). A decrease of 45% was observed in the elastic modulus of the material after cell seeding and maturation. This new, simple and versatile methodology herein proposed was successfully validated for the production of tubular structures that can be useful for a variety of applications, not only in tissue engineering, but also as models for in vitro testing of drugs and diagnostics studies.

Keywords: tubular scaffold, vascular tissue engineering, hydrogel, chitosan, pectin

3.4.2. Introduction

The human body contains several tubular organs such as trachea, esophagus, intestines, ureters, arteries and veins. The blood vessels are the most complex tubular structures, presenting an intricate histological arrangement, a wide range of diameters and an ability to resist to relatively high pressures. The materials commonly used to repair or substitute diseased vascular tissues include synthetic grafts made of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), polyethylene terephthalate (PET) or Dacron (polyester fibers). Examples of commercially available biomaterials of this category include Gore-tex[®] Stretch (Gore), Fusion Bioline[®], HemaShield[®] Gold, Intergard[®] Silver (Macquet), Vaskutek[®] Gelsoft[™], Vaskutek[®] Weave[™] (Terumo), E-Vita Open Plus[™] and Flownit Bioseal[®] (Jotec). For small-diameter vessels (inner diameter lower than 6 mm), on the other hand, these materials often cause thrombotic reactions that lead to vessel reocclusion (Bouten *et al.*, 2014; Góra *et al.*, 2016).

The complications associated with the use of synthetic vascular substitutes for small caliber blood vessels motivated the development of functional tubular structures by the incorporation of human cells. Most of the vascular tissue engineering approaches consist in the use of a three-dimensional frame structure (scaffold), composed of natural or synthetic materials that will support the human cells in the tissue regeneration process. The final tubular structure is obtained after a period of cell culture in the scaffold, to allow cell distribution, attachment and/or

remodeling (Silva *et al.*, 2018; Wingate *et al.* 2012).

Hydrogels have received great attention as candidates for tissue engineering scaffolds due to their biocompatibility, microporous structure with tunable porosity and pore size (Jiang *et al.*, 2014). They are three-dimensional crosslinked hydrophilic networks of polymers and show a similar structure and large water content compared to the native extracellular matrix (ECM), mainly composed by glycosaminoglycans, collagen and elastin (El-Sherbiny and Yacoub, 2013; Geckil *et al.*, 2010).

Natural and synthetic polymers have been used to produce hydrogels (Geckil *et al.*, 2010). Among the natural polymers, polysaccharides are of great interest because they are highly abundant in nature, biocompatible, biodegradable, hydrophilic and structurally diverse (Zdrahala, 1996). Despite being vastly studied for tissue engineering applications, polysaccharides are not yet deeply explored for the specific use in vascular tissue engineering. Only a few works in the literature report the production of vascular substitutes composed exclusively by polysaccharides, focusing mainly in the use of chitosan or alginate for this purpose (Aussel *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Ozawa *et al.*, 2013).

The shape of the hydrogel-based scaffold is another important parameter that depends on the application, being tube-like geometries a prerequisite for vascular tissue engineering (Bouten *et al.*, 2011). Different approaches have been used for the fabrication of tubular scaffolds, including methods based on thermally induced phase-separation (Soletti *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2010), particulate-leaching (Badhe *et al.*, 2017; Knight *et al.*, 2013), dipping (Lovett *et al.*, 2007; O’Cearbhaill *et al.*, 2008), 3D printing (Pinnock *et al.*, 2016; Norotte *et al.*, 2009), electrospinning (Hasan *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2012), solvent casting/freeze-drying (Versteegden *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2014) rolling-up of films or cell sheets (Castillo-Cruz *et al.*, 2018; Zorlutuna *et al.*, 2010) and others. Each method present specific limitations for the fabrication of small caliber hollow tubes, such as difficulty of controlling the rolling-up of films around cylindrical templates, need of biological glues to maintain the tubular conformation, use of harmful solvents, and structural heterogeneity (Silva *et al.*, 2018). Those limitations can negatively affect the biological performance of the final scaffold.

In this work, an alternative technique for the fabrication of tubular-shaped scaffolds based on the casting of polymeric solutions by controlled crosslinking mediated by a semipermeable cast is proposed. This new technique is particularly attractive for the production

of tubular hydrogel structures based on polysaccharides or other molecular species passive of crosslinking with small molecules. The use of harmless solvents, the reduced processing time, the ease of assembly and disassembly of the experimental setup, with no need for extra components to assure tubular conformation, are clear advantages of this method.

Given this context, the aim of this work was to obtain a tubular hydrogel scaffolds, by using a simple, versatile, reliable and reproducible manufacturing technique. The feasibility of the method was assessed by producing chitosan-pectin tubular scaffolds crosslinked with calcium ions. Validation of the method was performed by characterizing the obtained structures regarding their physico-chemical and mechanical aspects, as well as their ability to support cell growth.

3.4.3. Materials and Methods

3.4.3.1. Materials

Chitosan-pectin scaffolds were prepared using chitosan of high molar weight (Ch, code 419419, lot number MKBP1333V, with deacetylation degree, DD, of 76 % and viscosity-average molar weight of 1002 kDa), pectin from citrus peel (P, code P9135, lot number SLBN9007V, galacturonic acid content of 80.2 %, methoxylation degree of 7.6 % and viscosity-average molar weight of 46.18 kDa), both from Sigma-Aldrich, glacial acetic acid (Synth), sodium hydroxide and calcium chloride dihydrate (Merck). The water used was purified in a Milli-Q[®] system (Millipore). All other reagents used were of analytical grade.

3.4.3.2. Production of the scaffolds

Chitosan-pectin tubular-shaped porous scaffolds (tCh-P) were produced using a new methodology, developed in the present work. The experimental setup (illustrated previously in chapter 3, section 3.1, sub-section 3.1.2.3), consisted of a polypropylene rod (tubular negative cast) positioned within a dialysis bag containing the polymeric mixture and immersed in a CaCl₂ solution.

The Ch-P polymeric mixture was obtained based on the procedure previously described for the fabrication of flat scaffolds (Sections 3.2 and 3.3). Briefly, 40 mL of chitosan solution at 1% w/v (in aqueous acetic acid solution, 1% v/v) and 20 mL of pectin solution at 2% w/v (aqueous solution) were mixed under controlled conditions (25 °C, 1000 rpm). The addition of 2.7 mL of NaOH 2M and 0.8 mL of CaCl₂ 2% (w/v) was performed to neutralize the pH of the

polymeric mixture and to promote the primary crosslinking of pectin, respectively.

The bottom end of a 12 cm long dialysis bag (regenerated cellulose Spectra/Por® 3 dialysis tubing, with 11.5 mm diameter and cut-off of 3500 Da) was tied and closed with nylon thread and the polypropylene rod cast (nominal diameter of 3.8 mm) was positioned inside it. Then, 6 mL of the Ch-P mixture was placed into the membrane with a syringe and the upper end of the membrane was closed. The system was immersed in 45 mL of 12 % (w/v) CaCl₂ solution in a 50 mL tube and refrigerated for 2 days (at *c.a.* 4 °C). This allowed Ca⁺² ions to cross the membrane, promoting the secondary crosslinking of pectin. The CaCl₂ solution was changed once after 24 h. Finally, the tubular-shaped hydrogel, considered as sufficiently reticulated and stable, was frozen at -80 °C and lyophilized for 24 h. The dry porous scaffold was removed of the casting system. Scaffolds characterization was performed with lyophilized samples. For the biological testing, the scaffolds were disinfected with ethanol solution (70 % v/v) overnight.

3.4.3.3. *Scaffolds characterization*

3.4.3.3.1. *Aspect and morphology*

The visual aspect of tubular hydrogel scaffolds before and after lyophilization was assessed with a photographic camera. For the evaluation of the scaffolds morphology, tubular materials were cut both transversally and longitudinally to assess cross-section, luminal and external surfaces. Samples were metalized with a thin layer of gold and analyzed by scanning electron microscopy (SEM) (LEO 440, Leica). Average pore size and wall thickness, as well as the inner diameter of the samples were determined by analyzing SEM images with the software Image J.

The total porosity (P, %) was calculated according to Equation 1:

$$P = \left(1 - \frac{\rho_{\text{apparent}}}{\rho_{\text{material}}}\right) \times 100 \quad (1)$$

where ρ_{apparent} (g/cm³) is the apparent density (calculated as the ratio between the mass and the volume of each sample), and ρ_{material} (g/cm³) is the true density measured by helium pycnometry (Accupyc 1330 Micromeritics).

3.4.3.3.2. *Stability in aqueous media*

The weight loss of the tubular scaffolds when immersed in water, PBS or DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin solution (Pen-Strep, Gibco) (hereafter referred to as DMEMsup) was determined gravimetrically. Sterile ring samples of the tubular scaffolds with approximately 5 mm in length (n=5) were weighed, soaked in 5 mL of liquid in 15 mL tubes and incubated at 37 °C for 7 days in the above-mentioned solutions. After the incubation time, the scaffold samples were removed, carefully washed with distilled water, frozen, freeze-dried and finally weighed.

3.4.3.3.3. *Mechanical properties*

The viscoelastic mechanical properties of tubular scaffolds were evaluated by tensile stress relaxation tests in the circumferential direction performed on ring-shaped samples (ring test), as described by Camasão *et al.* (2018). Prior to the tests, ring samples of about 8 mm in length were obtained from the scaffolds (n=3) and immersed in PBS for 1 h to swell. The dimensions of the samples were determined using a caliper, to measure the length, and a scanning laser interferometer (LaserMike 136, Series 183B, NDC Technologies), to measure the external diameter. Samples were mounted on L-shaped grips and tested using an ElectroPuls E1000 tester (Instron Corporation) equipped with a 5 N load cell. The tests were carried out in a PBS bath at 37 °C. A pre-strain of 5% was applied to the samples followed by 5 progressive stress-relaxation cycles, each consisting of 10% strain ramps (5%/s strain rate) and 600 s of relaxation at constant strain, reaching a final deformation of 55%. Induced force was recorded as a function of time and the nominal stress was calculated by taking into account the sample's nominal cross section and the residual load. Stress-strain curve fitting was performed using Equation 2, which describes the typical concave-upward shape of stress-strain data from mechanical tests on soft tissues (Lee, 2006):

$$\sigma = \frac{1}{\beta} (C e^{\beta \varepsilon} - \gamma) \quad (2)$$

where σ is the stress value, ε is the strain, and C , β , and γ are empirical constants. The elastic moduli of the scaffolds were calculated using the first derivative of the stress-strain curve at 40 % strain.

Compliance of the tubular scaffolds was determined based on the procedure described in the standard ISO 7198 (International Standardization Organization, 2016) for cardiovascular implants and tubular vascular prostheses. Scaffolds samples (n=3) (10 mm in length) were placed in a chamber filled with PBS in a LumeGen bioreactor (Instron Tissue Growth Technologies) equipped with a multi-purpose laser micrometer (charge-coupled device, Keyence Corporation) to measure changes in sample diameter with varying internal pressure. Due to the permeability of the samples, a highly deformable balloon was introduced in each sample, in accordance with the standard practice ISO 7198. After reaching a fully developed laminar flow, with a stable internal average pressure of 100 mmHg, a sinusoidal wave at 1 Hz was applied on the samples at pressures ranging from 80 mmHg to 120 mmHg. The compliance (C) of the sample (expressed as percentage by 100 mmHg) was calculated using Equation 3:

$$C = \frac{1}{\Delta P} \times \frac{\Delta D}{D} \times 10^4 \quad (3)$$

where ΔP is the pressure gradient, ΔD is the difference in the diameter when the pressure is applied, and D is the initial diameter of the tubular scaffold.

3.4.3.3.4. *Cell seeding in the tubular scaffolds and mechanical testing*

Collagen was used to facilitate cell penetration into the porous tubular scaffolds. The preparation of the cellularized collagen gel was done according to the procedures described by Camasão *et al.* (2018) and Bono *et al.* (2016). Type I collagen was extracted from rat tail tendons, solubilized in 0.02 N acetic acid at a concentration of 4 g/L, sterilized and processed according to a previously reported protocol (Rajan *et al.*, 2006). The collagen solution was mixed with a neutralizing buffer solution (3.5x DMEM supplemented with 60mM NaOH and 10mM HEPES) and with human smooth muscle cells (HSMC) suspended in DMEMsup in a volume proportion of 2:1:1. The cellularized gels had a final collagen concentration of 2 g/L (pH 7.2) and final cell concentration of 0.5×10^6 cells/mL.

Sterile ring-shaped samples of 12 mm in length were placed in sterile custom-made tubular casts (9 mm diameter) featuring a central polypropylene rod (3.8 mm diameter) cast supported by two gaskets, as described by Camasão *et al.* (2018). Cellularized collagen solution enough to cover the scaffold was poured into the cast. The system was placed in a container with

ice under a sterile biological hood and left for 40 minutes to avoid sudden collagen gelification, allowing its homogeneous penetration into the scaffold. The ice was removed and the samples equilibrated at room temperature for 1 h completing the gelification process. The external cast was then removed and the inner polypropylene rod supporting the tubular scaffold with the embedded gel was transferred into a vented culture chamber (50 mL tube with an adapted air filter) containing 30 mL of DMEMsup. This system was then incubated at 37 °C and 5% CO₂ for up to 7 days. Culture medium was changed daily.

Tensile stress relaxation in the circumferential direction tests were performed on tubular constructs seeded with HSMC after 7 days of culture (n=3), according to the protocol described in the previous section.

3.4.3.3.5. *Immunofluorescence and histological staining*

Immunofluorescence and histochemical analyses were performed to evaluate cell distribution and cell/matrix organization.

After 1 or 7 days of static culture, the tubular constructs (n=3) were rinsed with PBS, fixed in 3.7% formaldehyde (Sigma) for 1 h at room temperature and again washed with PBS. Samples were then exposed to PBS supplemented with 3% BSA for 20 min. The F-actin and nuclei were stained using rhodamine-conjugated phalloidin (1:200, Sigma) and DAPI (1:3000, Thermo Fischer Scientific), respectively, in a solution of PBS containing 3% BSA (Sigma) and 0.1% Saponin (Sigma) for 90 min in the dark. As a final step, the material was washed with 0.05% Tween 20[®] (Sigma) in PBS. Samples were kept in PBS until image acquisition was performed by using LSM 700 confocal laser scanning microscope (Zeiss) controlled by ZEN 2009 software.

For histochemical analyses, fixed samples were embedded in paraffin and cut in 10 µm sections. Sections were then deparaffinized with toluene, rehydrated through graded washes of ethanol in water (decreasing ethanol concentrations of 100, 95, 80, and 0%) and stained using a modified Masson's Trichrome procedure. The following dye solutions were added to stain respectively the nucleus, the cytoplasm and the scaffold with collagen: Weigert's iron hematoxylin, acid fuchsin with xylydine ponceau and light green SF yellowish (Loy *et al.*, 2018).

3.4.3.4. *Statistical analysis*

The results obtained were analyzed using the Tukey test to determine statistically significant differences among averages at 95% confidence limits with the Software Statistica 7.0.

3.4.4. *Results and discussion*

The combination of chitosan with pectin has proven to be an attractive platform for tissue engineering applications due to its improved stability in culture medium and longer-term stability upon degradation, as well as enhanced mechanical properties, blood-contact response and cytocompatibility in comparison to chitosan-alginate scaffolds, commonly studied for this purpose (Sections 3.2 and 3.3). In the present section, the physico-chemical and mechanical properties, as well as the ability to support cell growth of chitosan-pectin tubular scaffolds prepared by the methodology proposed in this work are presented and discussed, considering their potential application as scaffolds for vascular tissue engineering.

3.4.4.1. *Aspect and stability in aqueous media*

The typical visual aspect and morphology of the chitosan-pectin tubular scaffolds are shown in Figure 1. Hydrogels obtained after the first step of fabrication, *i.e.*, before lyophilization (Figure 1 – A and B), could be easily removed from the polypropylene rod and presented a stable structure, being easily manipulated. Highly porous structures were obtained after freeze-drying was performed (Figure 1 – C and D), with average internal diameter of 4.15 ± 0.10 mm and wall thickness of 1.55 ± 0.15 mm. Micrographs of the cross-section of the tubular matrices revealed the presence of uniformly distributed and interconnected pores (Figure 1 – E), with average size of 359 ± 199 μm (Table 1). Pores were also evenly distributed along both luminal and outer surfaces, but also smooth regions were observed (Figure 1 – F and G).

The porosity of tCh-P scaffolds was calculated as 97.8 ± 0.5 % (Table 1), which is significantly higher than the porosity of Ch-P porous flat scaffolds produced in the presence of the surfactant Kolliphor® P188, with porosity of 78.4 ± 4.4 %, as reported in a previous work (Section 3.2). In that case, the porous structures were originated by foam formation due to the addition of the surfactant in the polymeric mixture during material fabrication and the average pore size was 566 ± 199 μm . The lyophilization process used herein to obtain the porous tCh-P matrices resulted in a structure with higher porosity and pore interconnectivity, as well as lower

average pore size in comparison to porous flat scaffolds. This architecture is expected to provide appropriate conditions and spatial organization for cell growth and to contribute to the diffusion of nutrients and removal of cell metabolites from the scaffold (Yang *et al.*, 2001). It is expected that cells will deposit ECM on the scaffold skeleton, gradually decreasing its porosity and contributing to reduce the permeability of the material to blood as required for its intended application.

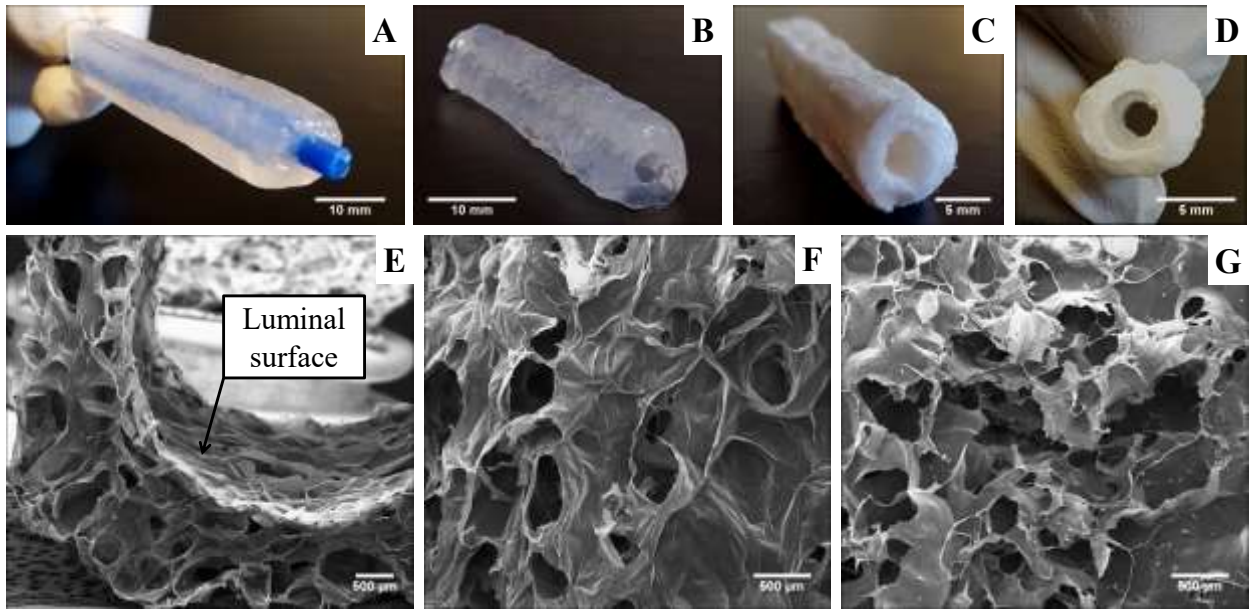


Figure 1: Typical visual aspect of chitosan-pectin tubular scaffolds (tCh-P) prior to lyophilization, in the polypropylene rod used as cast (A) or after removal of the rod (B); and after lyophilization (C and D). Micrographs of cross section (E), luminal surface (F) and outer surface (G) of tCh-P.

The stability of tCh-P scaffolds was evaluated in terms of mass loss after 7 days of incubation in water, PBS or supplemented DMEM culture medium. The results, shown in Table 1, indicate that the mass loss in water was about 1.7 times higher than in complex media during the time of the study. According to Bueno *et al.* (2014), the presence of charged components in complex media, such as salts or proteins (in the case of DMEM), may lead to the screening of free charges of the polysaccharides, originating a compacted structure in which liquid penetration is hampered. Despite the higher porosity of the tCh-P scaffold, its stability in

DMEM culture medium is similar to that of the flat Ch-P porous scaffold in the same medium, reported in a previous work as approximately 32 % (Section 3.3).

Table 1: Pore size, porosity, stability in water, PBS or supplemented DMEM culture medium, and mechanical properties of chitosan-pectin tubular scaffolds.

Property		Value
Pore size (μm)		359 ± 199
Porosity (%)		97.8 ± 0.5
Mass loss in aqueous media (%)	Water	53.2 ± 2.3^a
	PBS	30.8 ± 3.6^b
	DMEMsup	32.2 ± 8.2^b
Elastic modulus (kPa)	without cells*	0.9 ± 0.2^a
	with cells**	0.5 ± 0.1^b
Compliance (%/100 mmHg)		1.4 ± 0.4

Different letters indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

*Elastic modulus at 40% strain calculated before cell seeding.

** Elastic modulus at 40% strain calculated after 7 days of HSMC culture.

3.4.4.2. *Cell seeding in tubular constructs*

Cell seeding in porous scaffolds is often hampered by the limited ability of cells to penetrate into the matrix, leading to their inhomogeneous distribution and heterogeneous properties of the final material. Cell entrapment is a technique in which living cells are retained within a matrix and can be used to facilitate cell seeding to porous scaffolds (Chan and Leong, 2008), especially into matrices with relatively complex tridimensional architectures, such as the tubular constructs herein studied. Collagen gel is often used for cell entrapment since collagen is the main component of most tissues and plays an important role in maintaining the biological and structural function of the extracellular matrix. Nevertheless, the use of pure collagen-based materials is often limited by its high cost and low mechanical strength and stability upon hydration (Nair and Laurencin, 2007; Dong and Lv, 2016). In this work, seeding of human smooth muscle cells in the chitosan-pectin tubular scaffolds was done using collagen gel as a matrix to facilitate their penetration and entrapment in the porous structures.

Histological staining on transversal sections of samples (Figure 2) show that HSMC

successfully penetrated the tCh-P scaffold structure, as most of the pores were filled with the collagen gel and cells are appropriately distributed throughout the structure after 1 and 7 days of culture. Confocal laser scanning fluorescence microscopy images (Figure 3) support the homogeneous distribution of the seeded HSMC within the matrix after 7 days of maturation. Thus, HSMC seeding to the material was efficiently achieved by using collagen gel as a vehicle for cell migration and entrapment in the scaffold structure.

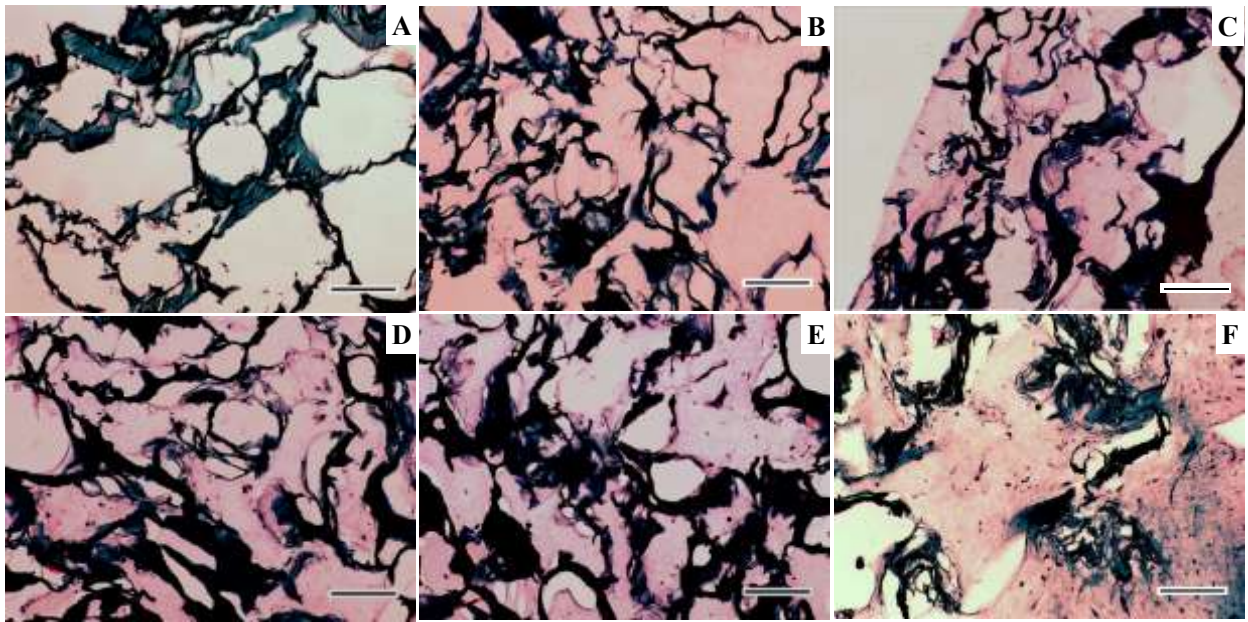


Figure 2: Histological characterization by modified Masson's Trichrome staining of the transversal sections of tubular constructs. (A) chitosan-pectin tubular scaffold (tCh-P); (B) tCh-P filled with collagen gel; (C) tCh-P filled with collagen gel entrapping cells at an initial concentration of 0.5×10^6 cells/mL_{gel}, after 24 h of maturation; (D-E) tCh-P filled with collagen gel entrapping cells at an initial concentration of 0.5×10^6 cells/mL_{gel}, after 7 days of maturation. tCh-P is stained in dark blue, collagen in light red and cell nuclei in dark brown. Images contrast and color balance were enhanced using the software Image J to facilitate the distinction between tCh-P and collagen. Scale bars are 300 μ m.

Camasão *et al.* (2018) produced tubular collagen gel-based scaffolds cellularized with smooth muscle cells and analyzed the impact of cell seeding density on the gel compaction rate, expression and deposition of vascular proteins, and also on the mechanical properties of the

constructs for up to 1 week of maturation. The authors observed that for the cell density of 0.5×10^6 cells/mL_{gel} (the same used in the present work), the matrix was effectively compacted and its volume was reduced to about 25% and less than 10% of the original volume after 24 h and 7 days of maturation, respectively. In the present study, it is also possible to observe a certain level of collagen compaction, given that, in the absence of cells, the gel apparently fills most of the void spaces within the tCh-P scaffold (Figure 2 – B) but in the presence of the HSMC (Figure 2 – C-F), partial detachment of the collagen gel from the scaffold pores seems to have occurred. However, compaction of the tCh-P structure itself does not appear to have occurred, indicating that it acts as a skeleton for the cellularized collagen gel, avoiding changes and collapse in the overall structural arrangements of the matrix.

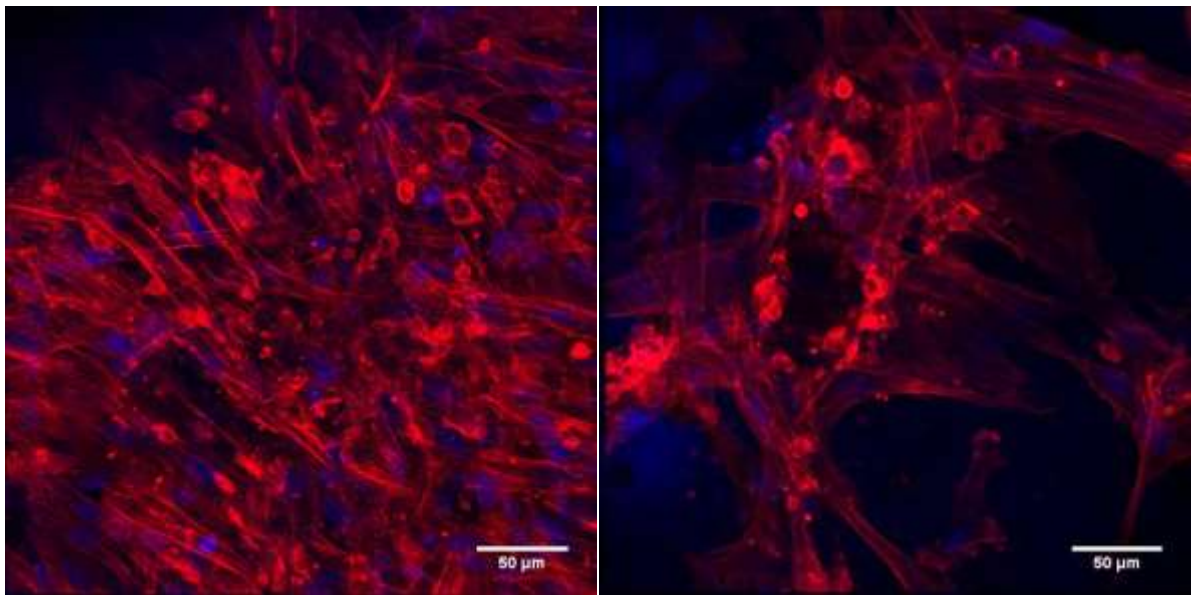


Figure 3: Representative confocal laser scanning microscopy images of the outer (left) and luminal (right) surfaces of chitosan-pectin tubular constructs filled with collagen gel entrapping cells at an initial concentration of 0.5×10^6 cells/mL_{gel} after 7 days of maturation. HSMC were stained by rhodamine-conjugated phalloidin (red fluorescence) to label F-actin and with DAPI (blue fluorescence) for nuclei.

3.4.4.3. *Mechanical properties*

The mechanical properties of tCh-P scaffolds were assessed in terms of compliance and tensile stress relaxation in the circumferential direction. The circumferential stress relaxation

tests were done before and after HSMC culture in the tubular constructs for 7 days. Stress-strain curves are shown in Figure 4 and the calculated elastic moduli of the tubular scaffolds are presented in Table 1.

The circumferential compliance of tubular devices corresponds to the variation on the diameter of the tube as a response to a varying internal pressure. In this study, the pressure inside the tubular scaffolds was varied from 80 to 120 mmHg (to simulate physiological conditions) and the resultant variation on their external diameter was recorded. The compliance of the Ch-P tubular scaffolds was calculated as $1.4 \pm 0.4 \text{ \%/100 mmHg}$.

Castillo-Cruz *et al.* (2018) obtained tubular grafts made of Tecoflex® SG-80A (thermoplastic polyurethane) with circumferential compliance of 1.05%/100 mmHg and compared their properties to those of commercially available polymers traditionally used for large diameter vascular grafts, such as ePTFE (0.90%/100 mmHg) and Dacron (1.90%/100 mmHg). According to the authors, even though their graft is less compliant than natural tissues, such as saphenous veins (4.40%/100 mmHg) and carotid arteries (14.0%/100 mmHg), it is possible to tailor the properties of the material in order to achieve improved compliance, given that it is related to the structural properties (wall thickness and radius) of the material, as well as to the materials elastic modulus and Poisson's ratio. The same observations can be done for the tubular structures obtained in the present study, as they are in the same range of compliance indicated by the aforementioned authors and they are also passive of structural modifications and/or composition changes to achieve more adequate compliance values to match native vascular tissues.

The elastic modulus of $0.9 \pm 0.2 \text{ kPa}$ was calculated for tCh-P scaffolds at 40% strain in the circumferential direction. After HSMC seeding and maturation for 7 days, this value decreased to approximately half of the initial modulus. Loy *et al.* (2018) produced tubular collagen gel-based scaffolds cellularized with smooth muscle cells at a density of $0.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}_{\text{gel}}$ and assessed the mechanical properties of the materials at different time points with the ring test. At day 0, the authors calculated the modulus of the construct as approximately 2 kPa and after 7 days of maturation, the modulus increased to about 11 kPa. This increase in the modulus with time was attributed to the cell-mediated compaction and remodeling of the collagenous matrix as well as water expulsion during maturation. The modulus herein calculated for tCh-P scaffolds is comparable to the value reported by the authors at day 0, however, after

cell seeding and maturation, the positive effect of the cell-mediated matrix remodeling on the scaffolds mechanical properties was not observed.

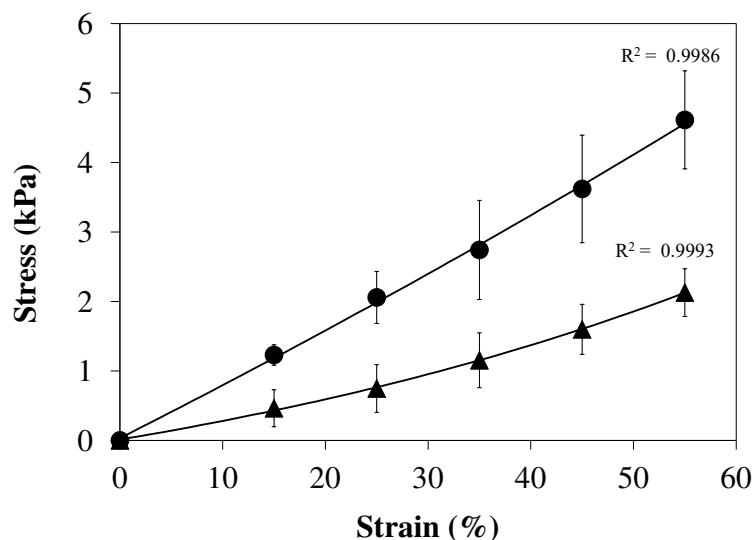


Figure 4: Stress-strain curves for chitosan-pectin tubular scaffolds (tCh-P) submitted to tensile loads in the circumferential direction. Experimental data obtained from the test with scaffolds: not seeded with cells (●) and seeded with human smooth muscle cells after 7 days of culture (▲). Solid lines represent the linear fit to experimental data (R^2 is the goodness of fit).

Due to the polysaccharide skeleton, a continuous collagen network is not formed, as the cellularized gel fills the pores of the tubular matrix. As discussed before, compaction of the cellularized collagen gel occurs inside the pores of the chitosan-pectin scaffold, thus, it has no effect on the organization of the matrix as a whole. Therefore, it is possible that, after 7 days of cell maturation, mass loss of the tCh-P scaffolds in the culture medium prevented the evolution of the mechanical properties of the material, which did not increase with the presence of the HSMC.

Some strategies may be used to improve the intrinsic mechanical properties of the tCh-P polysaccharide skeleton, such as augmenting the crosslinking density by varying the concentration of calcium ions either in the primary or in the secondary crosslinking steps of fabrication or altering the mass ratios and concentrations of the polymers. Moreover, this method of fabrication allows using a variety of combinations of polymers to produce tubular structures, thus, elastomers can be added to the polymeric mixture to improve the mechanical properties of the material. In a previous work (Section 3.2) it was demonstrated that the silicone gel Silpuran

2130 A/B[®], a polydimethylsiloxane, is able to increase the elastic modulus of chitosan-pectin scaffolds in up to 4 times.

3.4.5. Conclusions

A new methodology for the fabrication of hydrogel porous tubular scaffolds was developed, allowing the production of highly porous chitosan-pectin tubular constructs, with structure and dimensions appropriate for their use as scaffolds for the engineering of vascular tissues. The simplicity of the fabrication method combined to the ease of changing the experimental setup for tailoring the properties of the tubular scaffolds, such as diameter, length and wall thickness are strong advantages of this approach. Furthermore, the developed methodology can be extended to the production of tubular matrices based on different polymers that are passive of crosslinking with small molecules. Finally, HSMC seeding to the material was successfully achieved by using collagen gel as a vehicle for cell incorporation.

Although the tubular scaffolds herein described were intended for vascular tissues, the proposed methodology can be used for a variety of tissue engineering applications, considering the existence of many tubular-shaped structures in the human body. In addition to therapeutic purposes, the hydrogel tubular structures may also be used in the development of *in vivo* model systems for healthy and pathological tissues, being useful platforms for drug screening and diagnostic studies.

3.4.6. Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support to this research from São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil – Grants #2013/26534-1 and #2018/01858-0), Coordination for the Improvement of Higher Educational Personnel (CAPES, Brazil – Finance code 001), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Emerging Leaders in America Program (ELAP, Canada) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Program). We also thank Caroline Loy, Daniele Pezzoli and Francesco Copes (Université Laval, Canada) for providing insight and expertise that greatly assisted this research.

Capítulo 4:

ANÁLISE CONJUNTA DOS RESULTADOS

4. ANÁLISE CONJUNTA DOS RESULTADOS

No presente capítulo, os principais resultados obtidos são sumarizados em tabelas a fim de facilitar a apreciação do trabalho como um todo. Além disso, realiza-se uma análise comparativa dos resultados, interpretando-os e discutindo-os de maneira conjunta. Desta forma, torna-se possível visualizar a contribuição de cada etapa do estudo para se atingir o objetivo proposto.

Nas Tabelas 4.1 e 4.2 e 4.3 encontram-se sumarizados os principais resultados obtidos ao longo deste trabalho, apresentados nas seções 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente.

Os resultados das caracterizações preliminares dos *scaffolds* de geometria plana demonstraram que o uso de quitosana de média ou alta massa molar resulta em materiais com propriedades mais atrativas que aqueles produzidos com quitosana de baixa massa molar, pois apresentam melhor aspecto visual, porosidade adequada, e maior capacidade de absorção de meio de cultura. Logo, *scaffolds* de quitosana de alta ou média massa molar complexadas com alginato ou pectina, produzidos na presença ou não do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B e do tensoativo Kolliphor® P188 foram selecionados para estudos mais detalhados.

A análise da morfologia dos *scaffolds* de geometria plana demonstrou que a introdução do tensoativo às misturas poliméricas de Ch-A e Ch-P gera matrizes altamente porosas e com superfície mais rugosa em comparação às aquelas preparadas na ausência do aditivo. Em geral, a porosidade e a rugosidade da superfície foram maiores para formulações preparadas com pectina em relação às preparadas com alginato. Estas, por sua vez, são mais hidrofílicas e capazes de absorver maiores quantidades de soluções aquosas.

A capacidade de absorção de meio de cultura DMEM suplementado com antibiótico e soro fetal bovino foi maior para formulações contendo alginato densas preparadas na presença ou ausência do gel de silicone, comparadas às preparadas com pectina. Já no caso de matrizes porosas, também preparadas com ou sem o aditivo, a capacidade de absorção foi equivalente para formulações com alginato ou pectina. Ainda, *scaffolds* à base de Ch-P se mostraram mais estáveis em meio de cultura e frente à degradação enzimática pela presença de lisozima.

Tabela 4.1: Resultados apresentados na seção 3.2, na qual as formulações estudadas foram produzidas pela combinação de quitosana de alta ou média massa molar com alginato ou pectina, na presença ou não do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B e do tensoativo Kolliphor® P188.

Propriedade	Resultados	Observações
Morfologia da superfície e seção transversal	• Gotículas do gel de silicone observadas nas matrizes produzidas com Silpuran® 2130 A/B • Poros obtidos quando matrizes foram produzidas na presença de Kolliphor® P188	• Aspecto semelhante para matrizes produzidas com quitosana de alta ou média massa molar • Scaffolds contendo pectina possuem superfície mais irregular
Tamanho de poro	• 368 - 798 μm (Ch-A-K) • 518 - 880 μm (Ch-P-K)	• Maior porosidade das formulações contendo pectina atribuída à maior viscosidade da solução polimérica que leva à maior retenção de ar na matriz
Porosidade	• 62,0 - 70,5 % (Ch-A-K) • 78,4 - 83,3 % (Ch-P-K)	• Considerada adequada para o crescimento celular
Rugosidade	• Rugosidade em microescala 1.0 - 12.5 μm	• Maior em formulações porosas
Espessura	• Scaffolds secos 51,5 - 135,3 μm (densos) 229,7 - 1000,6 μm (porosos) • Aumento em PBS 9 a 23 vezes (Ch-A) 3 a 4 vezes (Ch-P)	• Formulações contendo pectina são mais espessas • A presença do gel de silicone não altera a espessura das matrizes em relação à respectiva isenta do composto
Ângulo de contato (água)	• Formulações contendo alginato 37° - 79° • Formulações contendo pectina 70° - 102°	• Presença do gel de silicone reduz a molhabilidade da superfície • Presença do tensoativo aumenta a molhabilidade da superfície
Capacidade de absorção de soluções aquosas	• Formulações contendo alginato 1,2 - 6,0 g/g (água) 9,0 - 21,7 g/g (PBS) absorção de 3 a 10 vezes maior em PBS • Formulações contendo pectina 1,1 - 5,4 g/g (água) 3,2 - 7,3 g/g (PBS) absorção de 1,5 a 4 vezes maior em PBS	• Maior capacidade de absorção de PBS em comparação à água foi atribuída ao efeito quelante dos íons fosfato presentes no tampão sobre os íons cálcio, ocasionando a redução da reticulação entre cadeias poliméricas e, consequentemente, a compactação da matriz
Perda de massa em soluções aquosas	• Formulações contendo alginato 33 a 80% em PBS • Formulações contendo pectina 5 a 22% em PBS	• Maior perda de massa pelas matrizes foi observada na presença de PBS em comparação à água
Módulo elástico (ensaio de relaxação após compressão)	• 0,7 - 210 kPa • Maior para formulações contendo silicone, quitosana de alta massa molar ou pectina • Presença de S aumenta o módulo elástico: 1,5 a 4,8 vezes (40% de deformação)	• Relação não linear entre tensão e deformação (strain-stiffening) • Formulações contendo pectina mostraram característica poroviscoelástica
Citotoxicidade indireta a células humanas endoteliais (HDF)	• Viabilidade de células tratadas com os extratos dos scaffolds é igual ou superior à viabilidade de células não tratadas	• Atividade metabólica celular aumenta na presença dos produtos de degradação dos scaffolds presentes no meio de cultura

Tabela 4.2: Resultados apresentados na seção 3.3, na qual as formulações estudadas foram produzidas pela combinação de quitosana de alta massa molar com alginato ou pectina, na presença ou não do tensoativo Kolliphor® P188.

Propriedade	Resultados	Observações
Capacidade de absorção de meio de cultura (DMEM)	• 5,6 - 17,0 g/g • Formulação densa contendo alginato é capaz de absorver 2,6 vezes mais meio de cultura que a respectiva contendo pectina	• Maior para formulações porosas • Formulações porosas contendo alginato ou pectina possuem capacidade de absorção similares entre si
Perda de massa em meio de cultura (DMEM)	• 8 - 32%	• Maior para formulações porosas
Espessura (DMEM)	• 380 - 1950 μm	• Formulação mais espessa é porosa contendo pectina
Biodegradação na presença de lisozima	• Presença da enzima não afeta a taxa de degradação da matriz	• Degradação das matrizes é lenta • Lisozima atua nas unidades acetiladas da quitosana, portanto o elevado grau de desacetilação da quitosana utilizada (76%) influenciou no resultado obtido
Adesão e ativação de plaquetas	• Formulações porosas mostram menor adesão e ativação de plaquetas em relação às respectivas densas • Formulações contendo pectina apresentam menos adesão e menores níveis de ativação de plaquetas em comparação às formulações contendo alginato e ao controle de poliestireno	• Adesão e ativação de plaquetas é governada pela topologia, hidrofiliabilidade e cargas livres na superfície do material, sendo esta última a que mais influenciou no resultado obtido neste estudo
Trombogenicidade	• 40 - 90% de hemoglobina livre em comparação ao controle Teflon®	• Maior para formulações contendo pectina • Considerado resultado satisfatório para material implantável
Módulo elástico (ensaio de relaxação após tensão)	• Formulações contendo alginato 3,4 - 10,2 kPa • Formulações contendo pectina 52,8 - 279,1 kPa	• Maiores deformações longitudinais alcançadas pelos scaffolds contendo pectina são mais adequadas para aplicação como patches vasculares
Citotoxicidade indireta a células musculares lisas (HSMC)	• Viabilidade de células tratadas com os extratos dos scaffolds é igual ou superior à viabilidade de células não tratadas	• Produtos de degradação dos scaffolds presentes no meio de cultura não apresentam citotoxicidade às células
Cultivo celular. Adesão, proliferação e viabilidade celular (HSMC)	• Ch-P: maior adesão e proliferação celular nessas matrizes. Aumento significativo na atividade metabólica celular é verificado no sétimo dia de cultivo • Ch-A: atividade metabólica celular não aumenta com o tempo de cultivo	• Melhor desempenho celular nas matrizes contendo pectina é atribuído principalmente, à sua maior resistência mecânica

Considerando as propriedades intrínsecas dos polímeros utilizados no trabalho e as condições de preparo das matrizes, tais como a razão M/G do alginato, o grau de desacetilação da quitosana e de esterificação da pectina, bem como a razão molar entre os polímeros, supõe-se que há um maior grau de reticulação nas matrizes preparadas com pectina, o que leva à formação de

uma estrutura mais compacta e dificulta a penetração de líquido na matriz. Esta suposição foi sustentada tanto por este resultado de absorção de meio de cultura quanto pelo de resistência mecânica das matrizes.

Tabela 4.3: Resultados apresentados na seção 3.4, na qual o material estudado foi produzido no formato tubular, pela combinação de quitosana de alta massa molar com pectina, segundo uma nova metodologia desenvolvida no presente trabalho.

Propriedade	Resultados	Observações
Dimensões	• Diâmetro interno: $4,15 \pm 0,10$ mm • Espessura da parede: $1,55 \pm 0,15$ mm	• Dimensões obtidas para os dispositivos atendem as requeridas para a aplicação desejada no reparo de vasos sanguíneos de calibre inferior a 6 mm
Poros	• Tamanho médio: 359 ± 199 μm • Porosidade: $97,8 \pm 0,5$ %	• Poros uniformemente distribuídos ao longo da matriz e interconectados
Perda de massa em meio aquoso	• Água: $53,2 \pm 2,3$ % • PBS: $30,8 \pm 3,6$ % • DMEM: $32,2 \pm 8,2$ %	• Presença de íons nos meios complexos diminui o potencial osmótico, reduzindo a entrada de água na matriz e, como consequência, a perda de massa é menor
Módulo elástico (ensaio de relaxação após tensão na direção circunferencial)	• $0,9 \pm 0,2$ kPa	• Após cultivo celular por 7 dias, o valor do módulo elástico se reduziu à metade do inicial, apresentado por matrizes sem células
Complância	• $1,4 \pm 0,4$ (%/100 mmHg)	• Similar à complância de enxertos poliméricos disponíveis comercialmente • Método de fabricação dos dispositivos tubulares permite modificação de sua estrutura para adequação do valor ao de tecidos nativos
Cultivo celular (HSMC)	• O uso do colágeno facilita a introdução e a distribuição homogênea da células na estrutura tubular tridimensional	• Colágeno penetra a estrutura tubular de Ch-P e preenche seus poros • Apreciável compactação é observada no gel de colágeno celularizado presente no interior dos poros após 7 dias de cultivo

O módulo elástico calculado para os *scaffolds* contendo pectina foi superior ao dos que contém alginato, tanto em testes de tensão quanto de compressão. O uso da pectina resultou em matrizes que exibem comportamento poroviscoelástico, uma característica mecânica importante para o desempenho de funções fisiológicas de diversos tecidos moles. Observou-se ainda que a presença do gel de silicone nas formulações aumenta seu módulo elástico.

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* contendo pectina influenciaram fortemente o desempenho de células musculares lisas nele inoculadas, sendo que maior adesão e proliferação celular foram observadas nestas matrizes em relação àquelas contendo alginato.

A avaliação da hemocompatibilidade dos *scaffolds* mostrou que formulações contendo pectina geraram resposta celular mais adequada, no que diz respeito à menor adesão e presença de plaquetas em estágios menos avançados de ativação, além de menores níveis de trombogenicidade, quando comparadas às formulações contendo alginato.

A adesão e a ativação de plaquetas na superfície dos *scaffolds*, avaliadas na seção 3.3, foram explicadas com base em propriedades de superfície dos materiais apresentadas na seção 3.2, como sua rugosidade, molhabilidade e presença de cargas livres. Este último fator foi tomado como o principal responsável pelo comportamento observado. Tendo em vista que, conforme inferido na seção 3.2, a extensão das interações entre grupos amino da quitosana e carboxila da pectina é maior que para o alginato, há supostamente menor quantidade de grupos amino livre na superfície de *scaffolds* de Ch-P. Logo, o fato de a adesão de plaquetas ser mediada pela adsorção de proteínas induzida pela presença de cargas positivas na superfície do material pode justificar a menor adesão observada nestes *scaffolds*.

Os resultados obtidos para os *scaffolds* de geometria plana evidenciaram as propriedades superiores das formulações à base de Ch-P para aplicação na engenharia de tecidos vasculares. Portanto, o complexo polieletrólito de quitosana-pectina foi selecionado para ser usado na produção de matrizes de geometria tubular. Para isso, uma nova metodologia para a obtenção de dispositivos tubulares foi desenvolvida, com base na moldagem da solução polimérica por reticulação controlada mediada por uma membrana semipermeável. O uso desta metodologia resultou em *scaffolds* homogêneos, estáveis e altamente porosos. A porosidade dos *scaffolds* tubulares foi superior à dos *scaffolds* porosos de geometria plana.

A fim de possibilitar a comparação das propriedades mecânicas destes *scaffolds* com as daqueles de geometria plana estudados anteriormente, preparou-se materiais planos porosos utilizando um método que envolve a liofilização da solução polimérica. Estes materiais foram submetidos a testes de relaxação após compressão, permitindo-se assim contrastar dados obtidos por testes mecânicos equivalentes, ou seja, com forças aplicadas na mesma direção, realizados nas matrizes produzidas pelos diferentes métodos. Os resultados dos testes de relaxação após compressão nos *scaffolds* planos obtidos por liofilização são mostrados no Apêndice E. Selecionando-se a deformação de 40%, para fins demonstrativos, o módulo elástico calculado para os *scaffolds* planos obtidos por liofilização foi 2,7 vezes menor que o apresentado por *scaffolds* planos produzidos na presença do agente porogênico Kolliphor® P188. Esta diminuição

no módulo deve-se provavelmente à maior porosidade dos materiais liofilizados.

A utilização de gel de colágeno para encapsulação de células musculares lisas facilitou a introdução e distribuição homogênea das células na estrutura tridimensional tubular dos *scaffolds*. Foi observada uma compactação do gel de colágeno celularizado no interior dos poros da matriz de Ch-P, sendo que esta funcionou como um esqueleto para a acomodação do gel e terminou por impedir a formação de uma matriz contínua de colágeno. Esperava-se, com base na literatura conhecida, que a remodelagem da matriz de colágeno, mediada pela presença de células, tivesse influência positiva nas propriedades mecânicas do dispositivo. No entanto, o perfil da distribuição do colágeno na matriz fez com que a presença do gel celularizado não contribuísse efetivamente para a melhoria destas propriedades.

Foram buscados na literatura trabalhos em que materiais com finalidades similares à proposta no presente estudo foram desenvolvidos, a fim de se realizar uma análise comparativa de suas propriedades. Além disso, características de materiais comercialmente disponíveis para uso em cirurgias vasculares também foram levantadas. Com isso, foi possível identificar similaridades e também lacunas a serem preenchidas visando à melhoria dos biomateriais aqui desenvolvidos, de forma que estes possam atender ao maior número possível dos requisitos necessários para sua aplicação na engenharia de tecidos vasculares.

Um grande número de materiais para uso em cirurgias vasculares está disponível comercialmente. Pode-se citar como exemplos os dispositivos Gore-tex® Stretch (Gore), Fusion Bioline®, HemaShield® Gold, Integrad® Silver (Macquet), Vaskutek® Gelsoft™, Vaskutek® Weave™ (Terumo), E-Vita Open Plus™ e Flownit Bioseal® (Jotec). Entretanto, as informações disponíveis acerca das propriedades destes materiais são limitadas, sendo mais voltadas para aspectos práticos de seu uso por cirurgias vasculares. Em sua grande maioria, estes materiais são constituídos de polímeros sintéticos como o ePTFE, PET e poliéster-uretano, em alguns casos impregnados com colágeno ou gelatina para melhorar sua biocompatibilidade. Em geral, são descritos como altamente biocompatíveis, pouco trombogênicos, facilmente manipuláveis e de fácil integração aos tecidos nativos por meio de suturas.

Verificou-se que muitos dos materiais propostos para o uso como *patches* vasculares reportados na literatura são produzidos a partir de tecidos biológicos descelularizados (Cho *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2017; Lux *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2008; Wilshao *et al.*, 2006) ou polímeros sintéticos, como poliuretano, policaprolactona, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), dentre

outros (Shin'oka *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Stock *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2017), sendo que uso de polímeros naturais é relatado com menor frequência (Aguilar *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2013; Malm *et al.*, 2009). Similarmente, são encontrados poucos trabalhos em que polímeros naturais, especialmente polissacarídeos, foram utilizados para a produção de dispositivos tubulares (Aussel *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Ozawa *et al.*, 2013).

No que se refere à morfologia dos materiais, *patches* vasculares produzidos utilizando-se tecidos biológicos de origem canina descelularizados (Cho *et al.*, 2005), com resultados bastante impactantes quanto à regeneração *in vivo* de tecido endotelial e muscular, apresentaram estruturas porosas e lamelares muito similares à microestrutura dos materiais porosos de geometria plana obtidos no presente trabalho (Ch-A-K e Ch-P-K). Outro material que demonstrou bom potencial de uso *in vivo* na regeneração de tecido vascular de cães, produzido a partir de um copolímero de poli(ácido láctico-co-caprolactona) e reforçado com fibras de poli(ácido glicólico), apresentou tamanho médio de poro de 80 μm e porosidade de 75%. Esta porosidade é comparável à de matrizes de Ch-A e Ch-P de geometria plana produzidas na ausência do gel de silicone aqui relatadas (71 a 79 %).

Elevada porosidade também foi reportada para *patches* vasculares produzidos a partir de poli(ácido láctico-co-caprolactona) reforçado com fibras de poli(ácido glicólico) ou poli(ácido láctico) no trabalho de Shin'oka *et al.* (2005). Materiais com poros de tamanhos variando entre 20 e 100 μm e porosidade superior a 80% foram obtidos. A porosidade é, neste caso, comparável à de matrizes de Ch-P contendo gel de silicone produzidas no presente trabalho (80 a 83 %).

De acordo com os trabalhos citados, verifica-se que as matrizes estudadas apresentaram elevada porosidade, comparável à dos materiais obtidos no presente trabalho, porém, tamanhos de poros menores, decorrentes do uso de diferentes métodos de fabricação. Em cada caso específico, os materiais se mostraram adequados quando estudados na presença de diferentes tipos celulares. Esta observação sugere que poros com tamanhos diferentes dos que foram obtidos neste trabalho podem ser necessários para melhor desempenho dos *scaffolds* em aplicações *in vivo*. O mesmo pode ser inferido a partir dos resultados mostrados por Pok *et al.* (2014), que obtiveram *patches* cardíacos a partir da mistura de quitosana com gelatina ou com o tecido descelularizado do miocárdio suíno em diferentes concentrações, com tamanhos médios de poro variando entre 50 e 130 μm . Neste mesmo trabalho, a espessura máxima dos materiais obtidos foi de 1,5 mm, sendo esta comparável à espessura das matrizes densas e porosas de Ch-A

e também da matriz porosa de Ch-P em DMEM (1,2 a 1,9 mm). Ainda no que se refere esta propriedade, *patches* produzidos utilizando-se o biopolímero poli(ácido 4-hidroxibutírico) (Stock *et al.*, 2000), que resultaram na formação de um tecido vascular organizado e funcional quando implantados em ovelhas, apresentaram espessura de 1,6 mm, comparável também à das formulações supracitadas. Estes materiais apresentavam porosidade superior a 95%, análoga à dos *scaffolds* de Ch-P produzidos por liofilização e de geometria tubular mostrados no presente trabalho.

Quanto à resposta de *patches* vasculares ao contato com sangue, foi comprovado que o uso de fosfatidilcolina na composição de matrizes à base de polímeros sintéticos as torna resistentes à adesão de plaquetas, melhorando consideravelmente seu desempenho (Zhang *et al.*, 2017). Portanto, esta é uma potencial abordagem a ser testada para melhorar a hemocompatibilidade dos *scaffolds* de Ch-P e especialmente de Ch-A, sendo que nestes últimos a adesão e ativação de plaquetas foi maior.

No que se refere ao módulo elástico, os materiais à base de quitosana obtidos por Pok *et al.* (2014) apresentaram módulos de compressão entre cerca de 10 e 50 kPa (para deformações de até 3% na espessura do materiais), sendo estes da mesma ordem de grandeza dos calculados para os *scaffolds* de Ch-A e Ch-P aqui reportados.

Na Seção 3.4 do Capítulo 3 discutiu-se a necessidade de melhoria das propriedades mecânicas e estabilidade dos *scaffolds* tubulares de quitosana-pectina obtidos neste trabalho. Nesse sentido, o uso da genipina para a reticulação extra do material (atuando nas cadeias da quitosana), apontado como eficiente por Silva *et al.* (2018), pode ser uma estratégia a ser abordada.

Outra estratégia já sugerida seria a incorporação de elastômeros à mistura polimérica, como o gel de silicone Silpuran® 2130 A/B, já utilizado para a melhoria das propriedades mecânicas dos *scaffolds* de geometria plana. O uso de polidimetilsiloxanos em materiais implantáveis pode gerar questionamentos a respeito de sua segurança, tendo em vista que estes compostos não são biodegradáveis e, uma vez implantados, permanecem no organismo por um longo tempo. No entanto, estes materiais já tem seu uso consolidado como constituintes de enxertos vasculares, sendo muito estudados pelo grupo do Dr. Soldani (Instituto de Fisiologia Clínica – Massa, Itália) (Soldani *et al.*, 1992; Spiller *et al.*, 2007; Spiller *et al.*, 2009; Soldani *et al.*, 2010) e se mostrando altamente biocompatíveis.

Capítulo 5:

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A caracterização preliminar de *scaffolds* de geometria plana produzidos com quitosana de diferentes massas molares demonstrou que o uso de quitosana de média ou alta massa molar resulta em materiais com propriedades mais atrativas que aqueles produzidos com quitosana de baixa massa molar, uma vez que possuem melhor aspecto visual, porosidade adequada, e maior capacidade de absorção de meio de cultura. Além disso, matrizes produzidas com quitosana de alta massa molar apresentaram resistência mecânica superior quando comparadas às produzidas com quitosana de média massa molar.

A adição do tensoativo Kolliphor® P188 resultou em materiais altamente porosos e a adição do gel de silicone Silpuran 2130® A/B acarretou em uma melhoria das propriedades mecânicas dos *scaffolds*, comprovada pelo aumento do módulo de elasticidade daqueles contendo o composto quando comparados às respectivas formulações preparadas sem o silicone.

A análise comparativa do uso dos diferentes poliânions, alginato e pectina, para complexação com a quitosana, mostrou que formulações contendo alginato são mais hidrofílicas e capazes de absorver maiores quantidades de soluções aquosas. Formulações contendo pectina por sua vez, se mostraram mais estáveis e mecanicamente resistentes. Além disso, o uso da pectina resultou em matrizes que exibem comportamento poroviscoelástico, uma característica mecânica importante para o desempenho de funções fisiológicas de diversos tecidos moles.

A avaliação da cito- e hemocompatibilidade dos *scaffolds* mostrou que formulações contendo pectina geraram resposta celular mais adequada no que diz respeito à adesão, proliferação e maior viabilidade de células musculares lisas e também à presença de plaquetas em estágios menos avançados de ativação, além de menores níveis de trombogenicidade, quando comparadas às formulações contendo alginato.

A nova metodologia desenvolvida para a obtenção de estruturas tubulares resultou em *scaffolds* homogêneos, estáveis e altamente porosos empregando-se quitosana e pectina, a combinação de polímeros considerada mais apropriada para o fim proposto. A utilização de gel de colágeno para encapsulação de células musculares lisas facilitou a introdução e distribuição homogênea das células na estrutura tridimensional tubular dos *scaffolds*.

Analizando-se o panorama geral deste trabalho, é possível constatar que, embora ainda pouco explorado e com poucos relatos na literatura, o uso da pectina para complexação

com a quitosana resulta em materiais com propriedades interessantes para aplicações na engenharia de tecidos. Estes materiais mostraram propriedades muitas vezes superiores às de matrizes de quitosana-alginato, já amplamente estudadas para tal finalidade. Sendo assim, pode-se afirmar que os materiais de geometria plana desenvolvidos neste trabalho são promissores para a aplicação como *patches* em cirurgias vasculares, como por exemplo nos procedimentos de endarterectomia. Além disso, a versatilidade do método desenvolvido para a produção de dispositivos tubulares permite vislumbrar a manipulação das características dos materiais obtidos de modo a reforçar sua potencial aplicação na engenharia de tecidos vasculares. Estes materiais atenderiam à necessidade clínica de dispositivos tubulares de pequeno calibre para a aplicação em cirurgias de substituição parcial de vasos sanguíneos ou *bypass*.

Portanto, este trabalho contribuiu para ampliação dos conhecimentos na área de engenharia de tecidos, por meio da obtenção de materiais constituídos essencialmente de polissacarídeos, com grande potencial para serem usados na reconstrução e reparo de vasos sanguíneos danificados.

Capítulo 6:
SUGESTÕES PARA
TRABALHOS FUTUROS

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O conjunto de resultados obtidos no presente trabalho permite vislumbrar uma série de trabalhos futuros que poderão ser realizados para sua continuidade, promovendo melhorias e fornecendo informações mais detalhadas a respeito das propriedades dos materiais estudados. As sugestões de trabalhos futuros são listadas a seguir:

- a) Tratamentos superficiais ou modificações na superfície dos materiais a fim de favorecer a adesão e proliferação celular. Conforme discutido neste trabalho, diversos fatores podem afetar o desempenho de células inoculadas em *scaffolds*, incluindo suas propriedades de superfície como molhabilidade e rugosidade. O uso de estratégias como o tratamento da superfície com plasma e deposição de nanofibras pode alterar estas propriedades e melhorar o desempenho celular. Funcionalização e recobrimento da superfície dos materiais com outros compostos podem também contribuir no sentido de aumentar a adesão celular aos *scaffolds*, sendo possível, por exemplo, se incorporar a proteína fibronectina ou o peptídeo RGD (sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico) à sua estrutura com esta finalidade.
- b) Acompanhamento da evolução da concentração celular por meio de coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) em conjunto com iodeto de propídeo (PI). O FDA é uma molécula não fluorescente que, em células vivas, é hidrolisada a fluoresceína, que, por sua vez, emite fluorescência. As células mortas não podem acumular ou hidrolisar o FDA. O PI, por outro lado, não pode atravessar a membrana de células viáveis, sendo capaz de atravessar apenas as membranas de células mortas e se intercalar com a dupla hélice de seu DNA. Portanto, este ensaio permite distinguir entre células vivas e mortas e possibilita a avaliação da proliferação celular ao longo do período do ensaio.
- c) Caracterização mecânica dos *scaffolds* por meio de testes mais relevantes no sentido de simular condições fisiológicas na aplicação das forças ao material. Por exemplo, testes de deformação cíclica a uma frequência de 1 Hz.

- d) Realização de testes de resistência à sutura e adesividade dos *scaffolds*. Estes testes são importantes pois, considerando uma possível aplicação do material *in vivo*, haveria necessidade de se realizar sutura ou utilizar adesivos biológicos para integrá-lo aos tecidos adjacentes.
- e) Aprofundamento dos estudos a respeito da metodologia de preparo de *scaffolds* tubulares de quitosana-pectina. Diversas variáveis podem ser estudadas a fim de se ajustar e melhorar as características do dispositivo final, incluindo aquelas relacionadas a variações no design experimental (tamanhos dos moldes e porosidade da membrana semipermeável), e também as relativas a características dos materiais empregados na produção dos tubos (origem e concentrações/proporções dos polímeros e agentes de reticulação utilizados), por exemplo.
- f) Utilização de estratégias para melhorar as propriedades mecânicas intrínsecas dos dispositivos tubulares formados, tais como a adição de elastômeros à mistura polimérica e/ou a variação do agente de reticulação. Reticulação extra da quitosana pode ser feita utilizando-se genipina ou tripolifosfato, por exemplo.
- g) Avaliação da pressão de ruptura dos dispositivos tubulares formados, propriedade importante na determinação de sua aplicabilidade na substituição de vasos sanguíneos ou outros tecidos e órgãos de geometria tubular do corpo humano.
- h) Utilização de carboximetilquitosana para obtenção dos hidrogéis tubulares. A carboximetilquitosana, ao contrário da quitosana, é solúvel em água, e permitiria portanto a produção do hidrogel sem a introdução de ácidos à mistura polimérica, possibilitando a manutenção do pH neutro ao longo de todo o processamento. Isso tornaria possível o estudo da produção de géis de carboximetilquitosana (combinada ou não com alginato ou pectina) celularizados em formato tubular, eliminando a dificuldade da etapa de produção de *scaffolds* tubulares em que as células devem ser inoculadas no material já pronto.
- i) Realização de cultivo de células endoteliais, características de tecidos vasculares, nos dispositivos tubulares, promovendo a endotelização de seu lúmen. Tal cultivo pode ser realizado simultaneamente ao de células musculares lisas, caracterizando assim uma co-

cultura. Após obtido o dispositivo contendo os dois diferentes tipos de células, estender o cultivo por 1 semana ou mais e avaliar a ocorrência ou não de compactação, distribuição e alinhamento das células na matriz e níveis de deposição de colágeno e elastina pelas células.

- j) Avaliação do desempenho de diferentes linhagens celulares (de células musculares lisas, células endoteliais, fibroblastos e/ou células tronco) semeadas sobre os materiais. As diferentes linhagens celulares podem responder de maneira diferente ao microambiente, sendo afetadas de maneiras distintas pelas propriedades do *scaffold*.
- k) Avaliação da imunogenicidade dos materiais.
- l) Ampliação da escala de produção dos *scaffolds*. É interessante investir esforços neste sentido, podendo para isso ser introduzidas técnicas como impressão 3D ou eletrofiação para a produção dos materiais.
- m) Avaliação do desempenho do material quando aplicado em testes *in vivo*.

Capítulo 7:

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Adekogbe, I.; Ghanem, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 7241-7250.
- Aguiar, J.L.A.; Lins, E.M.; Marques, S.R.B.; Coelho, A.R.B.; Rossiter, R.O.; de Melo, R.J.V. Surgarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. *Acta Cirúrgica Brasileira* 22 (2007) 77-81.
- Ahmed, M.; Ghanbari, H.; Cousins, B. G.; Hamilton, G.; Seifalian, A. M. Small calibre polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposite cardiovascular grafts: Influence of porosity on the structure, haemocompatibility and mechanical properties. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3857-3867.
- Algul, D.; Sipahi, H.; Aydin, A.; Kelleci, F.; Ozdatli, S.; Yener, F.G. Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate-chitosan/ β -TCP scaffold for osteochondral tissue. *International Journal of Biological Macromolecules* 79 (2015) 363-369.
- Applegate, E. *Anatomia e fisiologia*. Elsevier (2012). ISBN 978-85-352-5436-5.
- Archana, D.; Upadhyay, L.; Tewari, R.P.; Dutta, J.; Huang, Y.B.; Dutta, P.K. Chitosan-pectin-alginate as novel scaffold for tissue engineering applications. *Indian Journal of Biotechnology* 12 (2013) 475-482.
- Aussel, A.; Thébaud, N.B.; Bérard, X.; Brizzi, V.; Delmond, S.; Bareille, R.; Siadous, R.; James, C.; Ripoche, J.; Durand, M.; Montembault, A.; Burdin, B.; Letourneur, D.; L'Heureux, N.; David, L.; Bordenave, L. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: in vitro and in vivo evaluation. *Biomedical Materials* 12 (2017) 065003.
- Azevedo, E. P.; Retarekar, R.; Raghavan, M. L.; Kumar, V. Mechanical properties of cellulose: chitosan blends for potential use as a coronary artery bypass graft. *Journal of Biomaterials Science – Polymer Edition* 24 (2013) 239-252.
- Bacakova, L.; Filova, E.; Parizek, M.; Ruml, T.; Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* 29 (2011) 739-767.
- Badhe, R.V.; Bijukumar, D.; Chejara, D.R.; Mabrouk, M.; Choonara, Y.E.; Kumar, P.; du Toit, L.C.; Kondiah, P.P.D.; Pillay, V. A composite chitosan-gelatin bi-layered, biomimetic macroporous scaffold for blood vessel T.E. *Carbohydrate Polymers* 157 (2017) 1215-1225.

- Balan, V.; Verestiuc, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: a review. *European Polymer Journal* 53 (2014) 171-188.
- Barbanti, S. H.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 15 (2005) 13-21.
- Bellini, M. Z.; Caliari-Oliveira, C.; Mizukami, A.; Swiech, K.; Covas, D. T.; Donadi, E. A.; Oliva-Neto, P.; Moraes, A. M. Combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *Journal of Biomaterials Applications* (2014) 1-12.
- Bellini, M. Z.; Pires, A. L. R.; Vasconcelos, M. O.; Moraes, Â. M. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science* 125 (2012) E421-E431.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 35-52.
- Bergeron, V.; Cooper, P.; Fischer, C.; Giermanska-Kahn, J.; Langevin, D.; Pouchelon, A. Polydimethylsiloxane (PDMS)-based antifoams. *Colloids and Surfaces A* 122 (1997) 103-120.
- Bernabé, P.; Peniche, C. Argüelles-Monal, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. *Polymer Bulletin* 55 (2005) 367-375.
- Bierhalz, A.C.K; Moraes, A.M. Tuning the properties of alginate–chitosan membranes by varying the viscosity and the proportions of polymers. *Journal of Applied Polymer Science* 133 (2016) 44216, 1-11.
- Bierhalz, A.C.K; Westin, C.B; Moraes, A.M. Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp. *International Journal of Biological Macromolecules* 91 (2016) 496-504.
- Bigucci, F.; Luppi, B.; Cechiara, T.; Sorrenti, M.; Bettinetii, G. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 35 (2008) 435-441.
- Bono, N.; Pezzoli, D.; Levesque, L.; Loy, C.; Candiani, G.; Fiore, G.B.; Mantovani, D. Unraveling the role of mechanical stimulation on smooth muscle cells: a comparative study

- between 2D and 3D models. *Biotechnology and Bioengineering* 113 (2016) 2254-2263.
- Bouten, C.V.C.; Dankers, P.Y.W.; Driessen-Mol, A.; Pedron, S.; Brizard, A.M.A.; Baaijens, F.P.T. Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 221-241.
- Browning, M.B.; Dempsey, D.; Guiza, V.; Becerra, S.; Rivera, J.; Russell, B.; Höök, M; Clubb, F; Miller, M; Fossum, T; Dong, J. F.; Bergeron, A. L.; Hahn, M.; . Cosgriff-Hernandez, E . Multilayer vascular grafts based on collagen-mimetic proteins. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 1010-1021.
- Bueno, C. Z.; Moraes, Â. M. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties. *Journal of Applied Polymer Science* 122 (2011) 624-631.
- Bueno, C.Z. Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas; Campinas (2010).
- Bueno, C.Z.; Dias, A.M.A.; Sousa, H.C.; Braga, M.E.M.; Moraes, Â.M. Control of the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68. *Materials Science and Engineering C* 44 (2014) 117-125.
- Bueno, C.Z.; Moraes, Â. M; Souza, H. C.; Braga, M. E. M. Effects of supercritical carbon dioxide processing on the properties of chitosan–alginate membranes. *The Journal of Supercritical Fluids* 112 (2016) 128-135.
- Camasão, D.B.; Pezzoli, D.; Loy, C.; Kumra, H.; Levesque, L.; Reinhardt, D.P.; Candiani, G.; Mantovani, D. Increasing cell seeding density improves elastin expression and mechanical properties in collagen gel-based scaffolds cellularized with smooth muscle cells. *Biotechnology Journal* (2018) 1700768.
- Castillo-Cruz, O.; Pérez-Aranda, C.; Gamboa, F.; Cauich-Rodríguez, J.V.; Mantovani, D.; Avilés, F. Prediction of circumferential compliance and burst strength of polymeric vascular grafts. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 79 (2018) 332-340.
- Chan, B.P.; Leong, K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal* 17 (2008) S467-S479.
- Chandran, P.L.; Barocas, V.H. Microstructural mechanics of collagen gels in confined

- compression: poroelasticity, viscoelasticity, and collapse. *Journal of Biomechanical Engineering* 126 (2004) 152-166.
- Chang, H.; Wang, Y. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds, In: *Advances in biomaterials science and biomedical applications*. D. Eberli Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2; Chapter 27 (2011) 569-588.
- Chaudhuri, O.; Gu, L.; Darnell, M.; Klumpers, D.; Bencherif, S.A.; Weaver, J.C.; Huebsch, N.; Mooney, D.J. Substrate stress relaxation regulates cell spreading. *Nature Communications* 6 (2015) 6364.
- Chen, A.; Liang, S.; Thouas, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* 38 (2013) 584-671.
- Chi, N.; Yang, M.; Chung, T.; Chou, N.; Wang, S. Cardiac repair using chitosan-hyaluronan/silk fibroin patches in a rat heart model with myocardial infarction. *Carbohydrate Polymers* 92 (2013) 591-597.
- Cho, S.W.; Jeon, O.; Lim, J.E.; Gwak, S.J.; Kim, S.S.; Choi, C.Y.; Kim, D.I.; Kim, B.S. Preliminary experience with tissue engineering of a venous vascular patch by using bone marrow-derived cells and a hybrid biodegradable polymer scaffold. *Journal of Vascular Surgery* 44 (2006) 1329-1340.
- Cho, S.W.; Park, H.J.; Ryu, J.H.; Kim, S.H.; Kim, Y.H.; Choi, C.Y.; Lee, M.J.; Kim, J.S.; Jang, I.S.; Kim, D.I.; Kim, B.S. Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices. *Biomaterials* 26 (2005) 1915-1924.
- Chudobova, D.; Nejdl, L.; Gumulec, J. Krystofova, O., Rodrigo, M. A. M.; Kynicky, J.; Ruttkay-Nedecky, B.; Kopel, P.; Babula, P.; Adam, V.; Kizek, R. Complexes of silver(I) ions and silver phosphate nanoparticles with hyaluronic acid and/or chitosan as promising antimicrobial agents for vascular grafts. *International Journal of Molecular Sciences* 14
- Coimbra, P.; Ferreira, P.; de Sousa, H.C.; Batista, P.; Rodrigues, M.A.; Correia, I.J.; Gil, M.H. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 48 (2011) 112-118.
- Colas, A.; Curtis, J. Classes of materials used in medicine: Silicones (Section I.2.B), In: *Biomaterials science – An introduction to materials in medicine*. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Eds.; Elsevier, Inc.: San Diego, 3rd edition (2013) 82-87.

- Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 49 (2013) 780-792.
- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 981-1014.
- Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D.S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science* (2011) 1-19.
- Discher, D.E.; Janmey, P.; Wang, Y. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310 (2005) 1139-1143.
- Discher, D.E.; Mooney, D.J.; Zandstra, P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324 (2009) 1673-1677.
- Docheva, D.; Müller, S.A.; Majewski, M.; Evans, C.H. Biologics for tendon repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 84 (2015) 222-239.
- Dong, C.; Lv, Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. *Polymers* 42 (2016) 1-20.
- Dvir, T.; Timko, B.P.; Kohane, D.S.; Langer, R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology* 6 (2011) 13-22.
- El-Sherbiny, I.M.; Yacoub, M.H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and Challenges. *Global Cardiology Science and Practice* 38 (2013) 317-342.
- Engler, A.; Bacakova, L.; Newman, C.; Hategan, A.; Griffin, M.; Discher, D. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophysical Journal* 86 (2004) 617-628.
- Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126 (2006) 677-689.
- Espitia, P.J.P.; Du, W.X.; Avena-Bustillos, R.J.; Soares, N.F.F.; McHuch, T.H. Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties - a review. *Food Hydrocolloid* 35 (2014) 287-296.
- Fawcett, A.S.; So, H.Y.; Brook, M.A. Silicone foams stabilized by surfactants generated *in situ* from allyl-functionalized PEG. *Soft Matter* 6 (2010) 1229-1237.
- Freier, T.; Koh, H.S.; Kazazian, K.; Shoichet, M.S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* 26 (2005) 5872-5878.
- Furuya, D.C.; Costa, S.A.; Oliveira, R.C.; Ferraz, H.G.; Junior, A.P.; Costa, S.M. Fibers obtained

- from alginate, chitosan and hybrid used in the development of scaffolds. *Materials Research* 20 (2017) 377-386.
- Gao, L.P.; Du, M.J.; Lv, J.J.; Schmull, S.; Huang, R.T.; Li, J. Use of human aortic extracellular matrix as a scaffold for construction of a patient-specific tissue engineered vascular patch. *Biomedical Materials* 12 (2017) 065006.
- Geckil, H.; Xu, F.; Zhang, X.; Moon, S.; Demirci, U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine* 5 (2010) 469-484.
- George, M.; Abraham, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release* 114 (2006) 1-14.
- Ghaffari, A.; Navaee, K.; Oskoui, M.; Bayati, K.; Rafiee-Tehrani, M.; Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit RS intended for sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67 (2007) 175-186.
- Gombotz, W.R.; Wee, S.F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Review* 31 (1998) 267-285.
- Gong, Z.; Niklason, L. E. Blood Vessels Engineered from Human Cells. *Trends in Cardiovascular Medicine* 16 (2006).
- Gonzalez, A.C.O.; Costa, T.F.; Andrade, Z.A.; Medrado, A.R.A.P. Wound healing – A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 91 (2016) 614-620.
- Góra, A.; Pliszka, D.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S. Tubular tissues and organs of human body - challenges in regenerative medicine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16 (2016) 19-39.
- Goycoolea, F.M.; Arguelles-Monal, W.; Peniche, C.; Higuera-Ciajara, I. Chitin and chitosan. *Novel Macromolecules in Food Systems* (2000) 265-308.
- Guarino, V.; Caputo, T.; Altobelli, R.; Ambrosio, L. Degradation properties and metabolic activity of alginate and chitosan polyelectrolytes for drug delivery and tissue engineering applications. *AIMS Materials Science* 2 (2015) 484-502.
- Gulseren, G.; Goktas, M.; Ceylan, H.; Tekinay, A.B.; Guler, M.O. Nanomaterials for bone tissue regeneration and orthopedic implants, In: *Therapeutic Nanomaterials*. Guler, M.O.; Tekinay, A.B., Ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New Jersey; Chapter 6 (2016) 119-151.
- Guo, S.; Zuh, X.; Loh, X.J. Controlling cell adhesion using layer-by-layer approaches for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C* 70 (2017) 1163-1175.

- Hamman, J.H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine Drugs* 8 (2010) 1305-1322.
- Hasan, A.; Memic, A.; Annabi, N.; Hossain, M.; Paul, A.; Dokmeci, M. R.; Dehghani, F.; Khademhosseini, A. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 11-25.
- Hashi, C.K.; Zhu, Y.; Yang, G.; Young, W.L.; Hsiao, B.S.; Wang, K.; Chu, B.; Li, S. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA* 104 (2007) 11915-11920.
- Haug, A. Composition and Properties of Alginates; Norwegian Institute of Seaweed: Trondheim, Norway; Report N. 30. (1964).
- Heberer, G.; van Dongen, R.J.A.M. Vascular surgery. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1989). ISBN-13: 978-3-642-72944-7.
- Holzappel, B.M.; Reichert, J.C.; Schantz, J.T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Nöth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Hutmacher, D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (2013) 581-560.
- Hsu, S.H.; Whu, S.W.; Hsieh, S.C.; Tsai, C.L.; Chen, D.C.; Tan, T.S. Evaluation of chitosan-alginate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. *Artificial Organs* 8 (2004) 693-703.
- Hu, J.; Chao, W.; Lee, P.; Huang, C. Construction and characterization of an electrospun tubular scaffold for small-diameter tissue-engineered vascular grafts: A scaffold membrane approach. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 13 (2012a) 140-155.
- Hu, Y.; Suo, Z. Viscoelasticity and poroelasticity in elastomeric gels. *Acta Mechanica Sinica* 25 (2012b) 441-458.
- Huang, C.; Geng, X.; Ke, Q.; Mo, X.; Al-Deyab, S. S.; El-Newehy, M. Preparation of composite tubular grafts for vascular repair via electrospinning. *Progress in Natural Science: Materials International* 22 (2012) 108-114.
- Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (2000) 2529-2543.
- Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface* 3 (2006) 589-

601.

- International Standardization Organization ISO 7198. Cardiovascular implants and extracorporeal systems - Vascular prostheses - Tubular vascular grafts and vascular patches. International Organization for Standardization. Geneva, Suíça (2016).
- Irastorza, R.M; Drouin, B.; Blangino, E.; Mantovani, D. Mathematical modeling of uniaxial mechanical properties of collagen gel scaffolds for vascular tissue engineering. *The Scientific World Journal* (2015) 1-9.
- Jana, S.; Zhang, M. Fabrication of 3D aligned nanofibrous tubes by direct electrospinning. *Journal of Materials Chemistry B* 1(2013) 2575-2581.
- Jeong, S.I.; Krebs, M.D.; Bonino, C.A.; Samorezov, J.E.; Khan, S.A.; Alsberg, E. Electrospun chitosan-alginate nanofibers with in situ polyelectrolyte complexation for use as tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering: Part A* 17 (2011) 59-70.
- Ji, F.; Li, J.; Qin, Z.; Yang, B.; Zhang, E.; Dong, D.; Wang, J.; Wen, Y.; Tian, L.; Yao, F. Engineering pectin-based hollow nanocapsules for delivery of anticancer drug. *Carbohydrate Polymers* 177 (2017) 86-96.
- Jiang, Y.; Chen, J.; Deng, C.; Suuronen, E.J.; Zhong, Z., Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 35 (2014) 4969-4985.
- Jin, H.H.; Kim, D.H.; Kim, T.W.; Shin, K.K.; Jung, J.S.; Park, H.C.; Yoon, S.Y. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 51 (2012) 1079-1085.
- Keane, T.J.; Badylak, S.F. Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery* 23 (2014) 112-118.
- Kellar, R.S.; Lancaster, J.J.; Goldman, S.; McAllister, T.N.; L'Heureux, N. Capítulo 5.527 - Cardiovascular Tissue Engineering. In: *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier (2011).
- Knight, T.; Basu, J.; Rivera, E.A.; Spencer, T.; Jain, D.; Payne, R. Fabrication of a multi-layer three-dimensional scaffold with controlled porous micro-architecture for application in small intestine tissue engineering. *Cell adhesion & migration* 7 (2013) 267-274.
- Ko, T.M.; Cooper, S.L. Surface properties and platelet adhesion characteristics of acrylic acid and allylamine plasma-treated polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science* 47 (1993) 1601-1619.

- Kokkonen, H.E.; Ilvesaro, J.M.; Morra, M.; Schols, H.A.; Tuukkanen, J. Effect of Modified Pectin Molecules on the Growth of Bone Cells. *Biomacromolecules* 8 (2007) 509-515.
- Krawiec, J.T.; Vorp, D. A. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. *Biomaterials* 33 (2012) 3388-3400.
- Kumbhar, S.G.; Pawar, S.H. Self-functionalized, oppositely charged chitosan-alginate scaffolds for biomedical applications. *Biotechnology: An Indian Journal* 13 (2017) 1-15.
- Kurobe, H.; Maxfield, M.W.; Breuer, C.K.; Shinoka, T. Concise Review: Tissue-engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present, and future. *Stem Cells Translational Medicine* 1 (2012) 566-571.
- Lainé, A. Conception and validation of non-conventional mechanical characterization protocols specific to soft tissues for vascular application. Master thesis – Materials Science and Metallurgy Program – Laval University, Quebec City, Canada (2017).
- Lee, A.Y.; Mahler, N.; Best, C.; Lee, Y.; Breuer, C.K. Regenerative implants for cardiovascular tissue engineering. *Translational Research* 163 (2014) 321-341.
- Lee, J.M. Tissue mechanics, *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, John Wiley & Sons, Inc. (2006).
- Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 37 (2012) 106-126.
- Li, Z.; Ramay, H.R.; Hauch, K.D.; Xiao, D.; Zhang, M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 18 (2005) 3919-3928.
- Li, Z.; Wang, W.; Kratz, K.; Küchler, J.; Xu, X.; Zou, J.; Deng, Z.; Sun, X; Gossen, M; Ma, N; Lendlein, A. Influence of surface roughness on neural differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 64 (2016) 355-366.
- Liu, I.; Chang, S.; Lin, H. Chitosan-based hydrogel tissue scaffolds made by 3D plotting promotes osteoblast proliferation and mineralization. *Biomedical Materials* 10 (2015) 1-10.
- Lovett, M.L.; Cannizzaro, C.; Daheron, L.; Messmer, B.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D.L. Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. *Biomaterials* 28 (2007) 5271-5279.
- Loy, C.; Pezzoli, D.; Candiani, G.; Mantovani, D. A cost-effective culture system for the *in vitro* assembly, maturation, and stimulation of advanced multilayered multiculture tubular tissue models. *Biotechnology Journal* 13 (2018) 1700359.
- Lu, T.; Li, Y; Chen, T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional

- scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* 8 (2013) 337-350.
- Lux, M.; Andrée, B.; Horvath, T.; Nosko, A.; Manikowski, D.; Hilfiker-Kleiner, D.; Haverich, A.; Hilfiker, A. In vitro maturation of large-scale cardiac patches based on a perfusable starter matrix by cyclic mechanical stimulation. *Acta Biomaterialia* 30 (2016) 177-187.
- Ma, H.; Hu, J.; Ma, P.X. Polymer scaffolds for small-diameter vascular tissue engineering. *Advanced Functional Materials* 20 (2010) 2833-2841.
- Maciel, V.B.V.; Yoshida, C.M.P.; Pereira, S.M.S.S.; Goycoolea, F.M.; Franco, T.T. Electrostatic self-assembled chitosan-pectin nano- and microparticles for insulin delivery. *Molecules* 22 (2017) 1707.
- Majima, T.; Funakosi, T.; Iwasaki, N.; Yamane, S.T.; Harada, K.; Nonaka, S.; Minami, A.; Nishimura, S. Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Science* 10 (2005) 302-307.
- Malm, T.; Bowald, S.; Bylock, A.; Saldeen, T.; Busch, C. Regeneration of pericardial tissue on absorbable polymer patches implanted into the pericardial sac: an immunohistochemical, ultrastructural and biochemical study in the sheep. *Scandinavian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 26 (1992) 15-21.
- Mannheim, D.; Weller, B.; Vahadim, E.; Karmeli, R. Carotid endarterectomy with a polyurethane patch versus primary closure: a prospective randomized study. *Journal of Vascular Surgery* 41 (2005) 403-408.
- Manoli, S.; Avranas, A. Aqueous solutions of the double chain cationic surfactants didodecyldimethylammonium bromide and ditetradecyldimethylammonium bromide with Pluronic F68: Dynamic surface tension measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 436 (2013) 1060-1068.
- Mao, J.S.; Zhao, L.G.; Yin, Y.J.; Yao, K.D. Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials* 24 (2003) 1067-1074.
- Marques, S. R. B; Lins, E. M.; Aguiar, J. L. A.; Albuquerque, M. C. S.; Rossiter, R. O.; Montenegro, L. T.; Vieira, R. J. Um novo substituto vascular: arterioplastia femoral em cães com remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar – avaliação hemodinâmica e histopatológica. *Jornal Vascular Brasileiro* 4 (2007) 309-315.
- Marreco, P.R.; Da Luz Moreira, P.; Genari, S.C.; Moraes, A.M. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes

- used as wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 71 (2004) 268-277.
- Martins, J. G.; Camargo, S.E.A.; Bishop, T.T.; Popat, K.C.; Kipper, M.J.; Martins, A. F. Pectin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. *Carbohydrate Polymers* 197 (2018b) 47-56.
- Martins, J.G.; de Oliveira, A.C.; Garcia, P.S.; Kipper, M.J.; Martins, A.F. Durable pectin/chitosan membranes with self-assembling, water resistance and enhanced mechanical properties. *Carbohydrate Polymers* 188 (2018a) 136-142.
- McClure, M.J.; Simpson, D.G.; Bowlin, G.L. Tri-layered vascular grafts composed of polycaprolactone, elastin, collagen, and silk: optimization of graft properties. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 10 (2012) 48-61.
- Meng, X.; Tian, F.; Yang, J.; He, C.; Xing, N.; Li, F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of Materials Science* 21 (2010) 1751-1759.
- Miller, W. L.; Burnet, J. C. Jr. Blood vessel physiology and pathophysiology. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v. 16, n. 2, p. 251-260 (1990).
- Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>>. Acesso em 02/06/18.
- Mirza, A.; Hyvelin, J.; Rochefort, G. Y.; Lermusiaux, P.; Antier, D.; Awede, B.; Bonnet, P.; Domenech, J.; Eder, V. Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiologic vascular wall. *Journal of Vascular Surgery* 47 (2008) 1313-1321.
- Montaño-Machado, V.; Chevallier, P.; Mantovani, D.; Pauthe, E. On the potential for fibronectin/phosphorylcholine coatings on PTFE substrates to jointly modulate endothelial cell adhesion and hemocompatibility properties. *Biomatter* 5 (2015) e979679.
- MTC – Midlands Technical College. The cardiovascular system: Blood vessels. Disponível em: <<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio211/chap19/chap19.html>>. Acesso em: 18/06/2014.
- Munarin, F.; Tanzi, M.C.; Petrini, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules* 51 (2012) 681-689.
- Murphy, C.M.; O'Brien, F.J. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in

- collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion and Migration* 4 (2010) 377-381.
- Muto, A.; Nishibe, T.; Dardik, H.; Dardik, I. Patches for carotid artery endarterectomy: current materials and prospects. *Journal of Vascular Surgery* 50 (2009) 206-213.
- Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798.
- National Institutes of Health: What is atherosclerosis? Disponível em: <<https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/atherosclerosis/#>>. Acesso em: 10/05/14.
- Neufurth, M.; Wang, X.; Tolba, E.; Dorweiler, B.; Schröder, H.C.; Link, T.; Diehl-Seifert, B.; Müller, W.E. Modular Small Diameter Vascular Grafts with Bioactive Functionalities. *Public Library of Science, PLoS One* 10 (2015) e0133632.
- Norotte, C.; Marga, F.S.; Niklason, L.E.; Forgacs, G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* 30 (2009) 5910-5917.
- NQVascular: Bypass surgery. Disponível em: <<http://www.nqvascular.com.au/bypass-surgery/>>. Acesso em 17/06/18.
- O'Cearbhaill, E.D.; Punchard, M.A.; Murphy, M.; Barry, F.P.; McHugh, P.E.; Barron, V. Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate. *Biomaterials* 29 (2008) 1610-1619.
- Oftadeh, R.; Connizzo, B.K.; Nia, H.T.; Ortiz, C.; Grodzinsky, A.J. Biological connective tissues exhibit viscoelastic and poroelastic behavior at different frequency regimes: application to tendon and skin biophysics. *Acta Biomaterialia* 70 (2018) 249-259.
- Okamoto, M.; John, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Progress in Polymer Science* 38 (2013) 1487-1503.
- Ozawa, F.; Ino, K.; Takahashi, Y.; Shiku, H.; Matsue, T. Electrodeposition of alginate gels for construction of vascular-like structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115 (2013) 459-461.
- Pandey, S.; Mishra, A.; Raval, P.; Patel, H.; Gupta, A.; Shah, D. Chitosan-pectin polyelectrolyte complex as a carrier for colon targeted drug delivery. *Journal of Young Pharmacists* 5 (2013) 160-166.
- Patel, K.; Bahadur, P.; Guo, C.; Ma, J. H.; Liu, H. Z.; Yamashita, Y.; Khanal, A.; Nakashima, K. Salt induced micellization of very hydrophilic PEO–PPO–PEO block copolymers in aqueous

- solutions. *European Polymer Journal* 43 (2007) 1699-1708.
- Pavia, F.C.; Rigogliuso, S.; La Carrubba, V.; Mannella, G.A.; Ghersi, G.; Brucato, V. Poly lactic acid based scaffolds for vascular tissue engineering. *Chemical Engineering Transactions* 27 (2012) 409-414.
- Pavlath, A. E.; Robertson, G. H. Biodegradable polymers vs. recycling: what are the possibilities. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 29 (1999) 231-241.
- Pinnock, C.B.; Meier, E.M.; Joshi, N.N.; Wu, B.; Lam, M.T. Customizable engineered blood vessels using 3D printed inserts. *Methods* 99 (2016) 20-27.
- Pires, A.L.R. Desenvolvimento de Curativos Flexíveis e Neutralizados de Quitosana e Alginato contendo Alphasan® RC 2000; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas; Campinas (2013).
- Pires, A.L.R.; Moraes, A.M. Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber. *Journal of Applied Polymer Science* 132 (2015) 1-9.
- Pok, S.; Benavides, O.M.; Hallal, P.; Jacot, J.G. Use of myocardial matrix in a chitosan-based full-thickness heart patch. *Tissue Engineering: Part A* 20 (2014) 1877-1887.
- Prabaharan, M.; Sivashankari, P.R. Prospects of bioactive chitosan-based scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine, In: *Chitin and chitosan for regenerative medicine*. Dutta, P.K., Ed.; Springer India (2016) 41-59.
- Rajan, N.; Habermehl, J.; Coté, M.F.; Doillon, C.J.; Mantovani, D. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature Protocols* 1 (2006) 2753-2758.
- Rao, S.B.; Sharma, C.P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research* 34 (1997) 21-28.
- Reed, S.; Lau, G.; Delattre, B.; Lopez, D.D.; Tomsia, A.P.; Wu, B.M. Macro- and micro-designed chitosan-alginate scaffold architecture by three-dimensional printing and directional freezing. *Biofabrication* 8 (2016) 015003.
- Reed, S.; Wu, B.M. Biological and mechanical characterization of chitosan-alginate scaffolds for growth factor delivery and chondrogenesis. *Journal Biomedical Materials Research: Part B, Applied Biomaterials* 105 (2017) 272-282.
- Rerkasem, K.; Rothwell, P.M. Systematic review of randomized controlled trials of patch

- angioplasty versus primary closure and different types of patch materials during carotid endarterectomy. *Asian Journal of Surgery* 34 (2011) 32-40.
- Rodrigues, A. P.; Sanchez, E. M. S.; Costa, A. C.; Moraes, A. M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science* 109 (2008) 2703-2710.
- Rodríguez-Vázquez, M.; Vega-Ruiz, B.; Ramos-Zúñiga, R.; Saldaña-Koppel, D.A.; Quiñones-Olvera, L.F. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. *BioMed Research International* (2015) 1-15.
- Salacinski, H. J.; Goldner, S.; Giudiceandrea, A.; Hamilton, G.; Seifalian, A. M. The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *Journal of Biomaterials Applications* 15 (2001) 241-277.
- Salgado, C.L.; Sanchez, E.M.S.; Mano, F.J.; Moraes, Â. M. Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. *Journal of Materials Science* 47(2012) 659-667.
- Schwarz, U.S.; Bischofs, I.B. Physical determinants of cell organization in soft media. *Medical Engineering & Physics* 27 (2005) 763-772.
- Sharma, B.R.; Naresh, L.; Dhuldhoya, N.C.; Merchant, S.U.; Merchant, U.C. An overview on pectins. *Times Food Processing Journal* (2006) 44-51.
- Shin'oka, T.; Matsumura, G.; Hibino, N.; Naito, Y.; Watanabe, M.; Konuma, T.; Sakamoto, T.; Nagatsu, M.; Kurosawa, H. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 129 (2005)1330-1338.
- Silva, J.M.; Rodrigues, L.C.; Silva, S.S.; Reis, R.L.; Duarte, A.R.C. Engineered tubular structures based on chitosan for tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications* 32 (2018) 841-852.
- Silverthorn, E.U. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*, 5ª Ed. Artmed Editora S.A. (2010). ISBN 9780321559807.
- Simão, A.F.; Précoma, D.B.; Andrade, J.P.; Correa Filho, H.; Saraiva, J.F.K.; Oliveira, G.M.M. *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz brasileira de prevenção cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 101 (2013) 1-63.
- Simon-Walker, R.; Romero, R.; Staver, J.M.; Zang, Y.; Reynolds, M.M.; Popat, K.C.; Kipper,

- M.J. Glycocalyx-inspired nitric oxide-releasing surfaces reduce platelet adhesion and activation on titanium. *ACS Biomaterials Science and Engineering* 3 (2017) 68-77.
- Siqueira, A.S.E.; Siqueira-Filho, A.G.; Land, M.G.P. Análise do impacto econômico das doenças cardiovasculares nos últimos cinco anos no Brasil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 109 (2017) 39-46.
- Society for Vascular Surgery: Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. Disponível em: <<https://vascular.org/patient-resources/vascular-treatments/endovascular-repair-abdominal-aortic-aneurysms>>. Acesso em 17/06/18.
- Soldani, G.; Bernabei, M.; Losi, P.; Burchielli, S.; Chiappino, D.; Kull, S.; Briganti, E. Spiller, D. Long term performance of small-diameter vascular grafts made of a poly(ether)urethane-PDMS semi-interpenetrating polymeric network. *Biomaterials* 31 (2010) 2592-2605.
- Soldani, G.; Panol, G.; Sasken, H.F.; Goddard, M.B.; Galletti, P.M. Small diameter polyurethanepolydimethylsiloxane vascular prostheses made by a spraying, phase- inversion process. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 3 (1992) 106-113.
- Soletti, L.; Nieponice, A.; Guan, J.; Stankus, J.J.; Wagner, W.R.; Vorp, D.A. A seeding device for tissue engineered tubular structures. *Biomaterials* 27 (2006) 4863-4870.
- Souza, R.F.B. Desenvolvimento de scaffolds de quitosana complexada com xantana para potencial aplicação na regeneração de tecidos ósseos guiada pelo periósteo; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas (2018).
- Souza, R.F.B.; Souza, F.C.B.; Moraes, Â.M. Analysis of the performance of polysaccharide membranes in aqueous media as a tool to assist wound dressing selection. *Journal of Applied Polymer Science* 134 (2017) 45386.
- Souza, R.F.B.; Souza, F.C.B.; Moraes, Â.M. Polysaccharide-based membranes loaded with erythromycin for application as wound dressings. *Journal of Applied Polymer Science* 133 (2016) 43428.
- Sowjanya, J.A.; Singh, J.; Mohita, T.; Sarvanan, S.; Moorthi, A; Srinivasan, N.; Selvamurugan, N. Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 109 (2013) 294-300.
- Sperling, C.; Fischer, M.; Maitz, M. F.; Werner, C. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials* 30 (2009) 4447-4456.

- Spiller, D.; Losi, P.; Briganti, E.; Sbrana, S.; Kull, S.; Martinelli, I.; Soldani, G. PDMS content affects in vitro hemocompatibility of synthetic vascular grafts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18 (2007) 1097-1104.
- Spiller, D.; Mirtelli, C.; Losi, P.; Briganti, E.; Sbrana, S.; Counoupas, S.; Kull, S.; Tonlorenzi, S.; Soldani, G. In vitro evaluation of the PEtU-PDMS material immunocompatibility: the influence of surface topography and PDMS content. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009) 2511-2520.
- Sriamornsak, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn University International Journal* 3 (2003) 206-228.
- Stock, U.A.; Sakamoto, T.; Hatsuoka, S.; Martin, D.P.; Nagashima, M.; Moran, A.M.; Moses, M.A.; Khalil, P.N.; Schoen, F.J.; Vacanti, J.P.; Mayer Jr, J.E. Patch augmentation of the pulmonary artery with bioabsorbable polymers and autologous cell seeding. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 120 (2000) 1158-1168.
- Tentor, F.R.; Oliveira, J.H.; Scariot, D.B.; Lazarin-Bidóia, D.; Bonafé, E.G.; Nakamura, C.V.; Venter, S.A.S.; Monteiro, J.P.; Muniz, E.C.; Martins, A.F. Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 102 (2017) 1186-1194.
- Thakur, B.R.; Singh, R.K.; Handa, A.K. Chemistry and Uses of Pectin - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37 (1997) 47-73.
- Thottappillil, N.; Nair, P.D. Scaffolds in vascular regeneration: current status. *Vascular Health and Risk Management* 11 (2015) 79-91.
- Tsai, R.; Chen, P.; Kuo, T.; Lin, C.; Wang, D.; Hsien, T.; Hsieh, H. Chitosan/pectin/gum arabic polyelectrolyte complex: Process-dependent appearance, microstructure analysis and its application. *Carbohydrate Polymers* 101 (2014) 752-759.
- Tu, Q.; Zhang, Y.; Ge, D.; Wu, J.; Chen, H. Novel tissue-engineered vascular patches based on decellularized canine aortas and their recellularization in vitro. *Applied Surface Science* 255 (2008) 282-285.
- Ucuzian, A.A.; Greisler, H.P. Chapter 6.628 - Vascular Grafts. In: *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier (2011).
- van Oeveren, W. Obstacles in Haemocompatibility Testing. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, article ID 392584 (2013) 1-14.

- Vascular surgery: Aneurysm surgery, leg artery disease & varicose vein treatment. Disponível em: <http://www.vascularinfo.co.uk/stroke-and-carotid-artery-surgery/carotid-endarterectomy/> >. Acesso em 17/06/18.
- Veiga, 2012. Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para liberação controlada de anti-inflamatórios; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas; Campinas (2012).
- Veiga, I.G.; Moraes, Â.M. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. *Journal of Applied Polymer Science* 124 (2012) E154-E160.
- Versteegden, L.R.; Hoogenkamp, H.R.; Lomme, R.M.; van Goor, H.; Tiemessen, D.M.; Geutjes, P.J.; Oosterwijk, E.; Feitz, W.F.; Hafmans, T.G.; Verdonschot, N.; Daamen, W.F.; van Kuppevelt, T.H. Design of an elasticized collagen scaffold: A method to induce elasticity in a rigid protein. *Acta Biomaterialia* 44 (2016) 277-285.
- Wacker Chemie: Silpuran® 2130 A/B, Technical data sheet; MSDS. Available in: <<http://www.wacker.com/cms/en/products/product/product.jsp?product=10747>>. Access on 16/05/18.
- Wang, G.; Wang, X.; Huang, L. Feasibility of chitosan-alginate (Chi-Alg) hydrogel used as scaffold for neural tissue engineering: a pilot study in vitro. *Journal of Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 31 (2017) 766-772.
- Wang, P.; Liu, J. Zhang, T. In vitro biocompatibility of electrospun chitosan/collagen scaffold. *Journal of Nanomaterials*, n. artigo: 958172 (2013a).
- Wang, Q.; Mohan, A.C.; Oyen, M.L.; Zhao, X. Separating viscoelasticity and poroelasticity of gels with different length and time scales. *Acta Mechanica Sinica* 30 (2014) 20-27.
- Wang, T.; Ji, X.; Jin, L.; Feng, Z.; Wu, J.; Zheng, J.; Wang, H.; Xu, Z. W.; Guo, L. L.; He, N. Fabrication and characterization of heparin-grafted poly-L-lactic acid-chitosan core-shell nanofibers scaffold for vascular gasket. *ACS Applied Materials & Interfaces* 5 (2013b) 3757-3763.
- Wang, Y.; Robertson, J.L.; Spillman, W.B.; Claus, R.O. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharmaceutical Research* 21 (2004) 1362-1373.
- Wang, Z.; Sun, B. Zhang, M.; Wang, Z.; Sun, B.; Zhang, M.; Ou, L.; Che, Y.; Zhang, J.; Kong, D. Functionalization of electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffold with heparin and

- vascular endothelial growth factors for potential application as vascular grafts. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 28 (2013c) 154-166.
- Wen, Q.; Janmey, P.A. Effects of nonlinearity on cell-ECM interactions. *Experimental Cell Research* 319 (2013) 2481-2489.
- Westin, C.B.; Trinca, R.B.; Zuliani, C.; Coimbra, I.B.; Moraes Â.M. Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan-xanthan scaffolds in the presence of kartogenin. *Materials Science and Engineering C* 80 (2017) 594-602.
- WHO (World Health Organization), The 10 leading causes of death in the world. Available at: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Fact sheet published on 24/05/2018. Accessed on june/2018.
- Wilkens, C.A.; Rivet, C.J.; Akentjeh, T.L.; Alverio, J.; Koury, M.; Acevedo, J.P. Layer-by-layer approach for a uniformed fabrication of a cell patterned vessel-like construct. *Biofabrication* 9 (2017) 1-17.
- Williams, D.F. Biocompatibility, In: *Tissue Engineering*. Blitterswijk, C.V.; Thomsen, P.; Hubbell, J.; Cancedda, R.; Bruijn, J.; Lindahl, A.; Sohier, J.; Williams, D.F., Eds.; Elsevier: San Diego, 1st edition; Chapter 9 (2008) 266.
- Wilshaw, S.P.; Kearney, J.N.; Fisher, J.; Ingham, E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Engineering* 12 (2006) 2117-2129.
- Wingate, K.; Bonani, W.; Tan, Y.; Bryant, S. J.; Tan, W. Compressive elasticity of three-dimensional nanofiber matrix directs mesenchymal stem cell differentiation to vascular cells with endothelial or smooth muscle cell markers. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 1440-1449.
- Wu, H.; Wang, T.; Kang, P.; Tsuang, Y.; Sun, J.; Lin, F. Coculture of endothelial and smooth muscle cells on a collagen membrane in the development of a small-diameter vascular graft. *Biomaterials* 28 (2007) 1385-1392.
- Yan, X.; Khor, E.; Lim, L. Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molar weights. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 58 (2001) 358-365.
- Yang, B.; Yin, Z.; Cao, J.; Shi, Z.; Zhang, Z.; Song, H.; Liu, F.; Caterson, B. In vitro cartilage tissue engineering using cancellous bone matrix gelatin as a biodegradable scaffold. *Biomedical Materials* 5 (2010) 1-8.
- Yang, S.; Leong, K.; Du, Z.; Chua, C. *The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering*.

- Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering* 7 (2001) 679-689.
- Yin, A.; Zhang, K.; McClure, M. J.; Huang, C.; Wu, J.; Fang, J.; Mo, X.; Bowlin, G. L.; Al-Deyab, S. S.; El-Newehy, M. Electrospinning collagen/chitosan/poly(L-lactic acid-co-epsilon-caprolactone) to form a vascular graft: Mechanical and biological characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101A (2013) 1292-1301.
- Zdrala, R.J. Hydrogels and vascular grafts – state of the art and beyond. *Macromolecular Symposia* 109 (1996) 135-143.
- Zhang, H.; Jia, X.; Han, F.; Zhao, J.; Zhao, Y.; Fan, Y.; Yuan, X. Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration. *Biomaterials* 34 (2013) 2202-2212.
- Zhang, J.; Liu, C.; Feng, F.; Wang, D.; Lu, S.; Wei, G.; Mo, H.; Qiao, T. A PC-PU nanoparticle/PU/decellularized scaffold composite vascular patch: synergistically optimized overall performance promotes endothelialization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 160 (2017) 192-200.
- Zhao, J.; Qiu, H.; Chen, D-L.; et al. Development of nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 56 (2013) 106-113.
- Zhao, P.; Deng, C.; Xu, H.; Tang, X.; He, H.; Lin, C.; Su, J. Fabrication of photo-crosslinked chitosan- gelatin scaffold in sodium alginate hydrogel for chondrocyte culture. *Biomedical Materials and Engineering* 24 (2014) 633-641.
- Zhao, X.; Huebsch, N.; Mooney, D.J.; Suo, Z. Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks. *Journal of Applied Physics* 107 (2010) 063509.
- Zhu, C.; Fan, D.; Wang, Y. Human-like collagen/hyaluronic acid 3D scaffolds for vascular tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 34 (2014) 393–401.
- Zitka, O.; Sobrova, P.; Adam, V.; et al. Nanotechnology for more efficient blood vessel replacements. *Chemické Listy* 107 (2013) 24-29.
- Zorlutuna, P.; Vadgama, P.; Hasirci, V. Both sides nano-patterned tubular collagen scaffolds as tissue-engineered vascular grafts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 4 (2010) 628-637.

APÊNDICE A

Detalhamento da metodologia utilizada para realização dos testes mecânicos de relaxação após tensão ou compressão

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* de geometria plana foram testadas em relação à relaxação após a aplicação de uma força de tensão longitudinal ou compressão da amostra. Já nos *scaffolds* de geometria tubular, a relaxação após a aplicação de uma força de tensão circunferencial foi testada. Em testes de relaxação, mede-se a variação da força ao longo do tempo para que se mantenha constante uma deformação inicialmente aplicada à amostra. A metodologia detalhada para realização destes testes bem como a forma de análise dos resultados obtidos é descrita nos itens a seguir.

A.1. Teste de relaxação após tensão

Os testes de relaxação após tensão foram realizados no equipamento universal para ensaios mecânicos ElectroPuls E1000 (Instron Corporation). A configuração das garras de fixagem das amostras variou conforme o tipo do ensaio, como ilustrado na Figura A.1.

A.1.1. Scaffolds de geometria plana: tensão longitudinal

Amostras de dimensões 2 cm x 1 cm foram previamente intumescidas em PBS e tiveram sua espessura medida por um micrômetro a laser (Lasermike 183-04, Techmet, EUA). Cada amostra foi posicionada entre as garras do equipamento com uma distância inicial entre garras de 10 mm (0% de deformação), e o conjunto foi mantido imerso em banho de PBS durante o ensaio (Figura A.1a). Ao se iniciar o teste, as garras do equipamento eram afastadas a uma velocidade de 0,05 mm/s, seguido de um intervalo para relaxação da amostra de 1000 s a uma deformação constante, a fim de se levar em consideração o comportamento viscoelástico do material, obtendo-se ao final desse intervalo um valor de tensão residual, ou seja, o valor da força aplicada na condição de equilíbrio. O teste consistiu de 10 rampas de deformação (5% de deformação/rampa), com deformação final nominal de 50%. A força induzida para manter a deformação constante foi monitorada em função do tempo, utilizando-se uma célula de carga de 5 N (Instron Corporation). A tensão nominal foi calculada considerando-se a área da seção transversal da amostra e a tensão residual, conforme será mostrado no item A.3.

A.1.2. *Scaffolds de geometria tubular: tensão circunferencial*

Amostras de geometria anular de comprimento nominal de 8 mm foram obtidas dos *scaffolds* tubulares e intumescidas em PBS por 1 h. Então, as dimensões de cada amostra foram determinadas por meio de um paquímetro, para medida do comprimento, e por um micrômetro a laser (Lasermike 183-04, Techmet, EUA), para a medida do diâmetro externo. A amostra foi posicionada no equipamento conforme a configuração mostrada na Figura A.1b e o conjunto foi mantido imerso em banho de PBS durante o ensaio. Uma célula de carga de 5N foi montada no equipamento. Uma pré-deformação de 5% foi aplicada à amostra, seguida de 5 ciclos de relaxação, consistindo de rampas de deformação de 10% (taxa de deformação de 5%/s) e 600 s de tempo de relaxação. Assim, alcançou-se uma deformação final de 55%. A tensão nominal foi calculada considerando-se a área da seção transversal da amostra e a tensão residual, conforme será mostrado no item A.3.

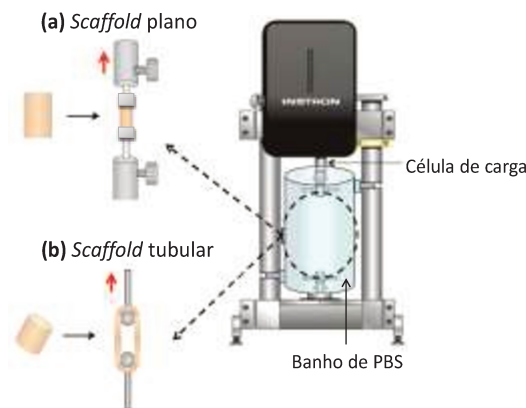


Figura A.1: Representação esquemática da configuração do equipamento utilizado no teste de relaxação após tensão para *scaffolds* planos (a) e *scaffolds* tubulares (b) (Adaptado de Meghezi, 2015).

A.2. *Teste de relaxação após compressão*

O teste de relaxação após compressão sem confinamento lateral foi realizado em amostras de *scaffolds* planos utilizando-se células de carga de 150 g ou 7 N (Mach 1, Biomomentum), para formulações porosas e densas, respectivamente. Amostras de diâmetro nominal de 10 mm foram previamente intumescidas em PBS e seu diâmetro foi então medido por meio de um micrômetro a laser (Lasermike 183-04, Techmet, EUA). Cada amostra foi imersa em

banho de PBS e sua espessura inicial foi determinada por meio do equipamento. O pistão se movia em direção à amostra com uma velocidade de 0,05 mm/s, gerando uma deformação constante, conforme ilustrado na Figura A.2. Quatro rampas de deformação foram aplicadas às amostras, com 10% de deformação a cada rampa, até que se atingisse a deformação nominal final de 40%. O tempo de relaxação a cada rampa foi de 2000 s para amostras não porosas e 5000 s para as amostras porosas. De maneira análoga ao teste de relaxação após tensão, a força induzida para manter a deformação constante foi monitorada em função do tempo, e a tensão nominal foi calculada considerando-se a área da amostra e a tensão residual ao final de cada rampa, conforme será mostrado no item A.3.

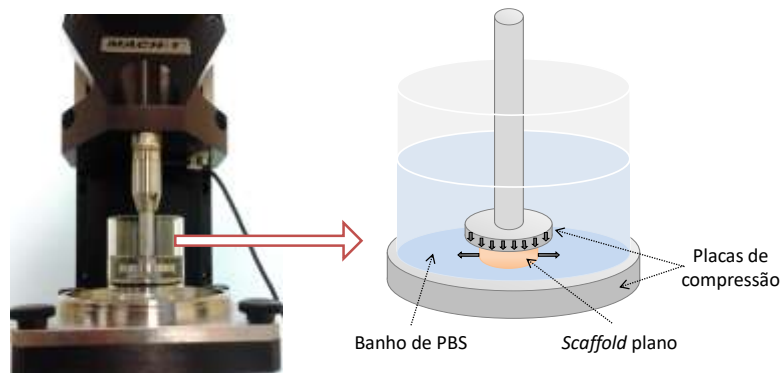


Figura A.2: Equipamento utilizado para o teste de relaxação após compressão sem confinamento lateral (Adaptado de Souza, 2018).

A.3. Forma de análise dos resultados

A forma de análise dos resultados de testes de relaxação análogos aos realizados neste trabalho foi descrita com detalhes anteriormente no trabalho de Souza (2018).

Dados da força aplicada pela célula de carga para manter a deformação constante em função do tempo, para cada rampa de deformação, são fornecidos pelos equipamentos de teste, gerando um conjunto de dados como o mostrado na Figura A.3. Os dados referentes a cada rampa foram ajustados no programa Matlab® (R2017a) utilizando-se a Equação A.1.

$$L = L_0 + L_1 \cdot e^{\left(\frac{-t}{T_1}\right)} + L_2 \cdot e^{\left(\frac{-t}{T_2}\right)} + L_3 \cdot e^{\left(\frac{-t}{T_3}\right)} \quad (\text{A.1})$$

onde L é a carga aplicada em função de um tempo t , L_0 é a carga residual ao fim de uma determinada rampa, T_1 , T_2 e T_3 são constantes de tempo e L_1 , L_2 e L_3 são constantes que se referem à contribuição de cada termo exponencial.

Na Figura A.4 está exemplificado o ajuste referente à curva gerada em uma das rampas, utilizando-se a Equação A.1, e os parâmetros calculados a partir deste ajuste.

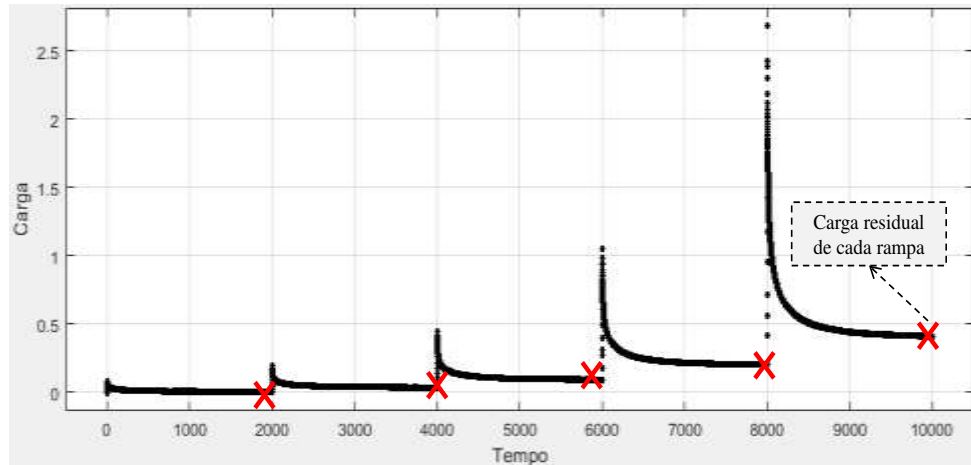


Figura A.3: Curva representativa de carga (ou força) *versus* tempo para 5 rampas de deformação, com um tempo de relaxação de 2000 s.

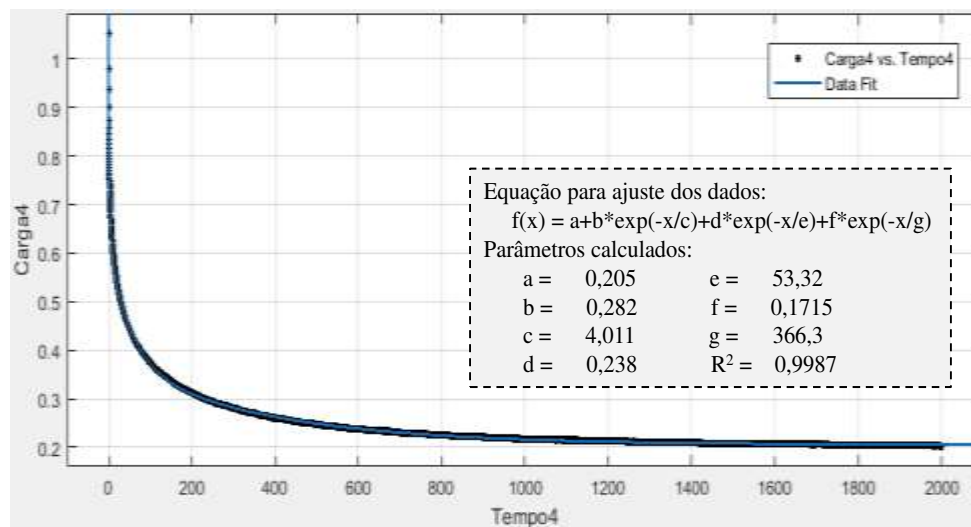


Figura A.4: Ilustração do ajuste dos dados de curva representativa de carga *versus* tempo (quarta rampa de deformação do conjunto de dados apresentado na Figura A.3), utilizando-se a Equação A.1. Os parâmetros calculados a partir deste ajuste são também mostrados.

Utilizando os valores de L_0 obtidos a partir do ajuste, foi possível calcular a tensão nominal ($\sigma_{nominal}$) e a deformação nominal ($\varepsilon_{nominal}$) em cada rampa. Para o ensaio de relaxação após aplicação de tensão longitudinal em amostras planas, utilizaram-se as Equações A.2 e A.3.

$$\sigma_{nominal} = \frac{L_0}{\text{Área}} = \frac{L_0}{s_0 \cdot w} \quad (\text{A.2})$$

$$\varepsilon_{nominal} = \frac{l_f - l_0}{l_0} \quad (\text{A.3})$$

onde Área corresponde à área onde a força é aplicada sobre a amostra, s_0 é a espessura, w é a largura e l_0 é o comprimento inicial e l_f é o comprimento final da amostra.

Para o ensaio de relaxação após aplicação de tensão circunferencial em amostras tubulares, utilizaram-se as Equações A.4 e A.5.

$$\sigma_{nominal} = \frac{L_0}{\text{Área}} = \frac{L_0}{l_s \cdot (D_e - D_i)} \quad (\text{A.4})$$

$$\varepsilon_{nominal} = \frac{D_f - D_0}{D_0} \quad (\text{A.5})$$

onde l_s é o comprimento, D_e é o diâmetro externo, D_i é o diâmetro interno, D_0 é o diâmetro inicial antes da aplicação da rampa de deformação (equivalente a D_i na primeira rampa) e D_f é o diâmetro final a amostra após a aplicação da rampa de deformação.

Para o ensaio de relaxação após compressão, utilizaram-se as Equações A.6 e A.7.

$$\sigma_{nominal} = \frac{L_0}{\text{Área}} = \frac{4 \cdot L_0}{\pi \cdot D_0^2} \quad (\text{A.6})$$

$$\varepsilon_{nominal} = \frac{s_0 - s}{s_0} \quad (\text{A.7})$$

onde D_0 é o diâmetro inicial, s_0 é a espessura inicial e s é a espessura final da amostra.

Utilizando-se as equações A.2 a A.7, de acordo com a natureza do teste, obteve-se a

curva tensão *versus* deformação para cada amostra (Figura A.5). Para cada formulação de *scaffold*, o teste foi realizado em triplicata, por isso, ao final da análise, foram obtidas três curvas como a da Figura A.5, cuja média foi apresentada nas seções resultados e discussões.

Para o ajuste da curva de tensão *versus* deformação, utilizou-se a Equação A.8 apresentada no trabalho de Lee (2006), que descreve o formato típico de curvas desse tipo obtidas para tecidos moles.

$$\sigma = \frac{1}{\beta} (C e^{\beta \varepsilon} - \gamma) \quad (\text{A.8})$$

onde C, β e γ são constantes empíricas utilizadas no ajuste de dados.

Por fim, o módulo de elasticidade foi calculado como a inclinação da curva a uma dada deformação, a partir do cálculo da primeira derivada da curva ajustada pela Equação A.8.

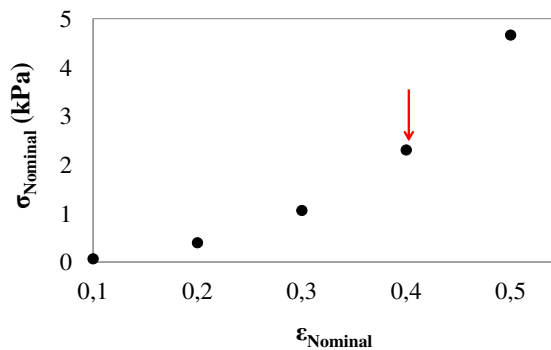


Figura A.5: Exemplo da curva de tensão *versus* deformação gerada para uma amostra submetida ao ensaio de compressão. A deformação pode ser expressa, alternativamente, em termos de porcentagem. Cada ponto foi obtido a partir da análise do conjunto de dados equivalente a uma determinada rampa de deformação. Indicado pela seta está o ponto gerado a partir da análise dos dados mostrados na Figura A.4.

Referências

- Lee, J.M. Tissue mechanics, Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering, John Wiley & Sons, Inc. (2006).
- Meghezi, S. Étude et amélioration des propriétés mécaniques de structures d'échafaudage à base de collagène pour la régénération du tissu vasculaire; Tese de doutorado; Faculté des sciences et de génie, Université Laval; Quebec, Canada (2015).
- Souza, R.F.B. Desenvolvimento de *scaffolds* de quitosana complexada com xantana para potencial aplicação na regeneração de tecidos ósseos guiada pelo periósteo; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas; Campinas (2018).

APÊNDICE B

Detalhamento da metodologia utilizada para produção do gel de colágeno celularizado e sua utilização para semear células musculares lisas em *scaffolds* tubulares de quitosana-pectina

Neste apêndice é descrita a metodologia para a preparação do gel de colágeno contendo células musculares lisas, bem como sua utilização como veículo para introduzir estas células às estruturas tridimensionais dos *scaffolds* tubulares de quitosana-pectina. A Figura B.1 mostra o esquema do procedimento experimental, que foi todo realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar a fim de manter a esterilidade do sistema como um todo.

O preparo do gel de colágeno celularizado foi realizado de acordo com protocolos descritos por Camasão *et al.* (2018) e Bono *et al.* (2016). Primeiramente, conforme ilustrado na Figura B.1a, preparou-se separadamente uma solução tampão neutralizante, constituída de DMEM 3,5x suplementado (com 1% de penicilina-streptomicina e 10% de soro fetal bovino), NaOH 60 mM e HEPES 10 mM. Preparou-se também a suspensão de células musculares lisas em DMEM 1x suplementado, a uma concentração adequada para se obter o gel de colágeno com uma densidade de células final de $0,5 \times 10^6$ células/mL_{gel}. Estas duas soluções foram misturadas a uma solução de colágeno de concentração 4 g/L na proporção de 1:1:2, ou seja, 1 volume da solução tampão para cada 1 volume da suspensão de células e 2 volumes da solução de colágeno. O gel celularizado obtido ao fim desta etapa possuía concentração de colágeno igual a 2 g/L.

Paralelamente, o *scaffold* tubular de Ch-P foi posicionado em um molde adaptado para a realização deste experimento, como ilustrado na Figura B.1b. O molde consiste de um elemento de moldagem externo (seringa adaptada) e outro interno (tubo de polipropileno de 3,8 mm de diâmetro), sendo que este último evita que o colágeno a ser adicionado obstrua o lúmen do *scaffold* tubular.

Adicionou-se então o gel de colágeno celularizado ao molde com o auxílio de uma pipeta e posicionou-se o sistema em uma caixa de gelo (ainda dentro da câmara de fluxo laminar), a fim de mantê-lo a baixa temperatura por 40 min. Dessa forma, evitou-se a rápida gelificação do colágeno, o que facilitou o intumescimento do *scaffold* com a mistura com células. Em seguida, o sistema foi removido do gelo e deixado dentro da câmara de fluxo laminar por 1 h a temperatura ambiente para permitir a gelificação da mistura de colágeno com células que penetrou a estrutura do *scaffold*.

Por fim, o molde externo foi removido e o sistema foi transferido a um tubo de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultura DMEM suplementado, conforme ilustrado na Figura B.1c. O sistema foi incubado a 37 °C e 5% CO₂ por até 7 dias, fazendo-se a troca do meio de cultura a cada dia.

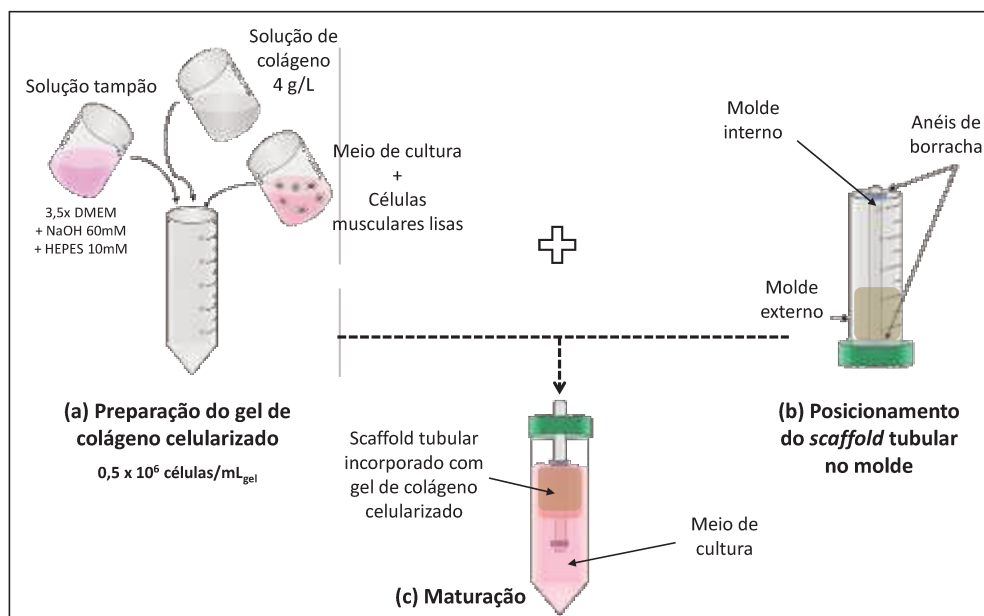


Figura B.1: Esquema da preparação do gel de colágeno contendo células musculares lisas e sua utilização como veículo para semear estas células em *scaffolds* tubulares de quitosana-pectina (Adaptado de Meghezi, 2015).

Referências

- Bono, N.; Pezzoli, D.; Levesque, L.; Loy, C.; Candiani, G.; Fiore, G.B.; Mantovani, D. Unraveling the role of mechanical stimulation on smooth muscle cells: a comparative study between 2D and 3D models. *Biotechnology and Bioengineering* 113 (2016) 2254-2263.
- Camasão, D.B.; Pezzoli, D.; Loy, C.; Kumra, H.; Levesque, L.; Reinhardt, D.P.; Candiani, G.; Mantovani, D. Increasing cell seeding density improves elastin expression and mechanical properties in collagen gel-based *scaffolds* cellularized with smooth muscle cells. *Biotechnology Journal* (2018) 1700768.
- Meghezi, S. Étude et amélioration des propriétés mécaniques de structures d'échafaudage à base de collagène pour la régénération du tissu vasculaire; Tese de doutorado; Faculté des sciences et de génie, Université Laval; Quebec, Canada (2015).

APÊNDICE C

Metodologia para determinação da massa molar viscosimétrica dos polissacarídeos

Neste apêndice é apresentada a metodologia para determinação das massas molares dos polissacarídeos utilizados no presente trabalho.

As massas molares dos biopolímeros utilizados foram determinadas por viscosimetria. Neste ensaio, soluções de diferentes concentrações do polímero são preparadas e seu respectivo tempo de escoamento no viscosímetro capilar do tipo Ostwald-Cannon-Fenske (200 mL) é medido. O viscosímetro foi mantido imerso em um banho termostático com circulação a 25 °C, sendo o volume de solução utilizado a cada medida de 10 mL. Para cada solução, foram realizadas de 3 a 10 medidas, dependendo do tempo de escoamento. As concentrações utilizadas para cada polímero e as respectivas referências para a escolha das mesmas são apresentadas na Tabela C.1. A viscosidade intrínseca (η) foi calculada de acordo com as Equações C.1 a C.5:

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad (C.1)$$

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{t-t_0}{t_0} \quad (C.2)$$

$$\eta_{esp.red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad (C.3)$$

$$\eta_{ine} = \frac{\ln(\eta_{rel})}{C} \quad (C.4)$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0}(\eta_{ine}) = \lim_{C \rightarrow 0}(\eta_{esp.red}) \quad (C.5)$$

onde η_{rel} é a viscosidade relativa, η_{esp} é a viscosidade específica, $\eta_{esp.red}$ é a viscosidade específica reduzida, η_{ine} é a viscosidade inerente, t é o tempo de escoamento da solução no viscosímetro, t_0 é o tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro e C é a concentração do polímero na solução.

A massa molar viscosimétrica média (M_v) foi calculada de acordo com a equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação C.6):

$$[\eta] = KM_v^a \quad (C.6)$$

As constantes “K” e “a” foram obtidas da literatura e dependem da temperatura, do solvente e do polímero utilizados. As constantes utilizadas, bem como os solventes e as respectivas referências são também mostradas na Tabela C.1.

Tabela C.1: Concentrações das soluções de polímeros e respectivos solventes utilizados para o ensaio de viscosimetria, constantes a e K utilizadas na equação de Mark-Houwink-Sakurada (Eq. C.6) e as respectivas referências consultadas.

Polímero	Concentrações utilizadas (g/mL)	Solvente	Constantes		Referências
			a	K (mL/g)	
Quitosana	0,001; 0,003; 0,006; 0,009; 0,012	Ácido acético 0,1 M e NaCl 0,2 M	0,93	$1,80 \times 10^{-3}$	Bueno (2015); Canella e Garcia (2011)
Alginato	0,002; 0,005; 0,007; 0,010; 0,015; 0,020	NaCl 0,1 M	0,96	$1,20 \times 10^{-2}$	Bueno (2015); Mancini <i>et al.</i> (1996)
Pectina	0,0015; 0,0025; 0,0050; 0,0075; 0,01	NaCl 0,01 M	0,8221	$2,34 \times 10^{-2}$	Masuelli (2011); Masuelli (2014)

Referências

- Bueno, C.Z. Desenvolvimento e análise das propriedades de membranas de quitosana e alginato contendo polihexametileno biguanida para o tratamento de lesões de pele; Tese de doutorado; Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas; Campinas (2015).
- Canella, A.M.N.C.; Garcia, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova* 24 (2001) 13-17.
- Mancini, M.; Moresi, M.; Sappino, F. Rheological behaviour of aqueous dispersions of algal sodium alginates. *Journal of Food Engineering* 28 (1996) 283-295.
- Masuelli, M. A. Mark-Houwink parameters for aqueous-soluble polymers and biopolymers at various temperatures. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry* 2 (2014) 37-43.
- Masuelli, M.A. Viscometric study of pectin - effect of temperature on the hydrodynamic properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 48 (2011) 286-291.

APÊNDICE D

Eletrofiação de membranas de PCL para utilização na moldagem de *scaffolds* tubulares

Membranas de PCL foram produzidas no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos, com a colaboração do então pós-doutorando Dr. Rafael Bergamo Trinca, integrante do grupo de pesquisa da Prof. Dra. Ângela Maria Moraes.

A montagem experimental de eletrofiação, baseada no trabalho de Trinca *et al.* (2017), consistiu de uma fonte de alta tensão controlada por software (positiva 0-30 kV, fabricada em laboratório), uma bomba de seringa programável (Samtronic Infusion Pump 670T), uma agulha 18-gauge em aço inoxidável e um coletor plano (manta de alumínio) ou cilíndrico rotativo. No sistema rotativo, hastes de vidro com 10 mm de diâmetro foram posicionadas entre a agulha e um eletrodo aterrado (a haste de vidro foi posicionada a menos de 1 cm de distância do eletrodo de aterramento) (Figura D.1). A haste de vidro foi acoplada a um rotor com velocidade fixa em 50 rpm. Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente e umidade relativa de 50% numa câmara com um sistema de ventilação.

Para a produção das membranas, soluções de PCL em clorofórmio:metanol (5:1, em volume) foram utilizadas, mantendo-se a distância entre agulha e coletor em aproximadamente 15 cm. A voltagem aplicada foi de 20 kV. Os demais parâmetros utilizados são apresentados na Tabela D.1.

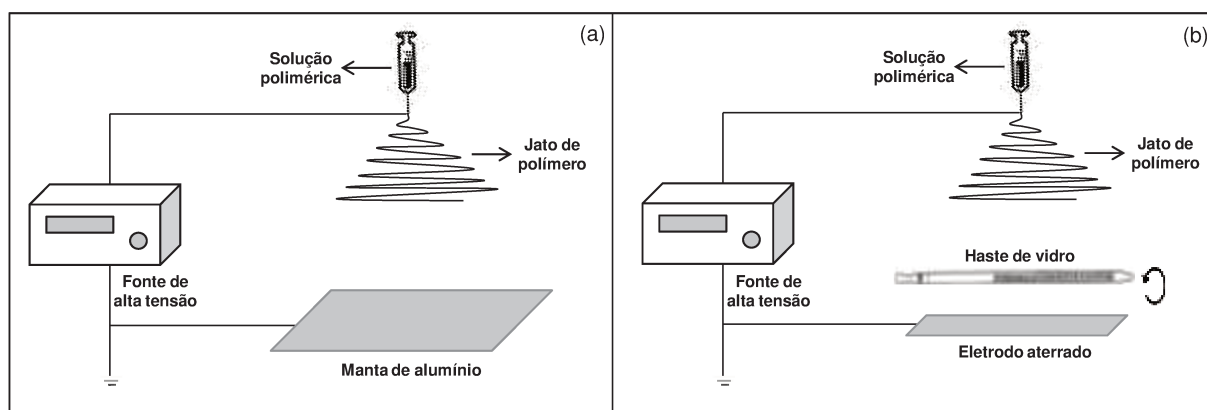


Figura D.1: Montagem experimental do sistema de eletrofiação utilizado para produção das membranas de PCL utilizadas na moldagem dos *scaffolds* tubulares, sendo (a) sistema para obtenção de membranas planas e (b) sistema para a obtenção de membranas tubulares.

Tabela D.1: Parâmetros utilizados para a confecção de membranas de PCL por eletrofição.

Número da amostra	Coletor	Concentração da solução de PCL (%)	Volume da solução de PCL (mL)	Vazão de infusão da solução de PCL (mL/h)
1	plano	15	8	15
2	cilíndrico	15	2	15
3	cilíndrico	15	3	20
4	cilíndrico	15	4	20
5	cilíndrico	10	4,5	15

Inicialmente, eletrofiou-se um filme de PCL de dimensões de cerca de 10 cm x 35 cm (Figura D.2a). Este filme foi enrolado utilizando-se como molde uma pipeta de 10 mL com diâmetro de 10 mm, de forma a se obter o tubo a ser utilizado como substituinte das membranas de diálise, no processo de moldagem dos *scaffolds* tubulares (Figura D.2c). No entanto, esta abordagem não resultou em uma membrana de PCL com características satisfatórias, pois seu interior continha uma emenda, conforme mostrado na Figura D.2d, que acarretaria em deformações no *scaffold* produzido.

A membrana de PCL deveria ser então eletrofiada diretamente em um molde tubular, a fim de evitar tal problema. A membrana tubular de PCL obtida por eletrofição diretamente em uma haste de vidro (pipeta) é mostrada na Figura D.2b.



Figura D.2: Membranas de PCL obtidas pela técnica de eletrofição: (a) membrana plana de PCL; (b) membrana tubular de PCL; (c) tubo de PCL obtido a partir da membrana plana; (d) tubo de PCL obtido a partir da membrana plana com detalhe para a emenda em seu interior.

As condições da eletrofiação das membranas tubulares de PCL foram variadas, conforme mostrado anteriormente na Tabela D.1. Para as formulações 2 a 4 variou-se o volume e a vazão de infusão da solução de PCL, mantendo-se sua concentração. Em nenhum dos casos foi possível obter membranas de porosidade e/ou espessura satisfatórias, uma vez que observou-se que a solução polimérica colocada no interior do material era capaz de atravessar sua parede para o meio exterior. Como uma tentativa de evitar a saída de solução polimérica, testou-se imergir a membrana de PCL em uma solução de CaCl_2 2% (m/v) previamente à inserção da mistura polimérica em seu interior, a fim de formar um fino filme polimérico em sua superfície interna quando da adição da mistura. Esta abordagem também não resultou na formação de uma estrutura tubular adequada, pois, apesar de não se observar saída do material para o exterior da membrana, o interior do *scaffold* formado, mais próximo ao molde de aço inoxidável, não foi apropriadamente reticulado.

A fim de diminuir o tamanho dos poros e corrigir o problema do vazamento de solução polimérica para o exterior da membrana de PCL, testou-se a redução da concentração da solução de PCL de 15% para 10% na amostra 5, mantendo-se a quantidade de material total da amostra 3, ou seja, 0,45 g de polímero. Em geral, o diâmetro da fibra formada aumenta com a concentração de polímero utilizada (Andrady, 2008), o que levaria à redução do tamanho dos poros se considerarmos que a mesma quantidade de fibras seja formada. Entretanto, quando a mesma quantidade de material é utilizada e reduz-se a concentração da solução polimérica, mas mantendo-se as dimensões do coletor, fibras mais finas serão formadas e em maior quantidade, resultando em uma matriz mais espessa e com poros de menor tamanho. Mesmo utilizando esta abordagem, a membrana obtida foi ainda muito fina e permeável à solução polimérica, logo o dispositivo resultante não foi adequado para sanar o problema, além de ser de difícil manuseio.

Referências

- Andrady, A. L. Science and technology of polymer nanofibers. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. (2008). ISBN: 978-0-471-79059-4.
- Trinca, R.B.; Westin, C.B.; Fracassi da Silva, J.A.; Moraes, A.M. Electrospun multilayer chitosan *scaffolds* as potential wound dressings for skin lesions. European Polymer Journal 88 (2017) 161-170.

APÊNDICE E

Avaliação de propriedades mecânicas de *scaffolds* planos liofilizados

Scaffolds porosos de geometria plana constituídos de quitosana complexada com pectina foram preparados por liofilização da solução polimérica a fim de permitir a comparação direta de suas propriedades mecânicas com aquelas de *scaffolds* planos preparados na presença do agente porogênico Kolliphor® P188.

Para o preparo dos *scaffolds* por liofilização, a solução de quitosana-pectina foi preparada conforme descrito anteriormente (Capítulo 3) e então vertida em poços de uma placa de poliestireno de 8 poços retangulares (dimensões 3 cm x 4 cm). A placa contendo a solução para moldagem foi então congelada a -80°C , liofilizada por 24 h e lavada por 1 h com uma solução de CaCl_2 (12% m/v).

Amostras circulares de 10 mm de diâmetro foram obtidas a partir dos *scaffolds* produzidos e realizou-se o teste de relaxação após compressão, conforme descrito no Capítulo 3 e detalhado no Apêndice A. A curva de tensão versus deformação obtida é mostrada na Figura E.1. O módulo de elasticidade calculado a 40% de deformação (demonstrativo) foi de $4,6 \pm 1,0$ kPa.

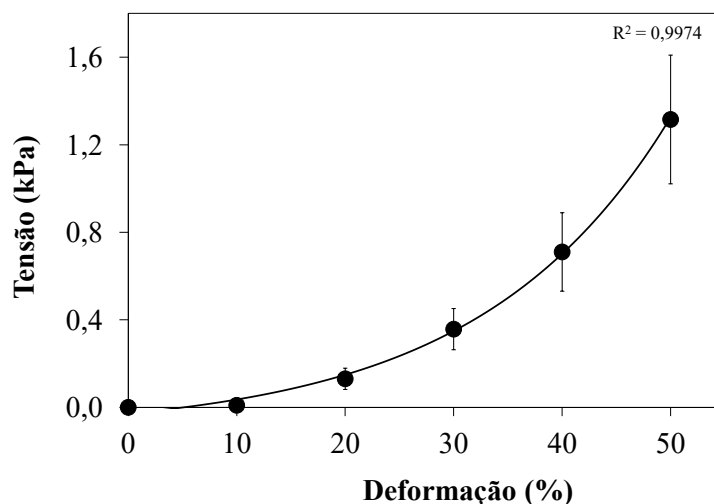


Figura E.1: Curva de tensão *versus* deformação obtida pelo teste de relaxação após compressão para *scaffolds* porosos de geometria plana preparados por liofilização e constituídos de quitosana complexada com pectina. Os dados experimentais são identificados pelos pontos e a linha contínua corresponde ao ajuste matemático, conforme descrito no Apêndice A. R^2 corresponde ao coeficiente de determinação do ajuste.